

**MicroPatent® FullText Record**[Help](#) [Close window](#)[Order/Download](#)[Family Lookup](#)[Front Page](#)[Legal Status](#)**JP3109599 A****ELECTRONIC STRINGED INSTRUMENT  
WITH MEMORY FUNCTION  
CASIO COMPUTER CO LTD****Abstract:**

**PURPOSE:** To reproduce the performance of the stringed instrument with musical tones by successively storing the time information which indicates the timing of a string touch operation and the pitch information corresponding to a fingering operating position as performance information at every time when the string touch operation is detected by a detecting means.

[no drawing]

**CONSTITUTION:** The time information indicating the timing of the string touch operation and the pitch information corresponding to the detected fingering operation position are stored as performance information successively into a performance information memory means 33 at every time when the string touch operation is detected by an input section 31 consisting of a pitch switch and trigger switch as the detecting means. The performance contents of the stringed instrument by the fingering operations and the string touch operations can be stored in real time in this way and the stored contents can be reproduced afterward with the musical tones in real time.

**COPYRIGHT:** (C)1991,JPO&Japio**Inventor(s):**MANABE HIROSHI  
MURATA YOSHIYUKI**Application No.** JP1990224255A **Filed** 19900828 **Published** 19910509**Original IPC(1-7):** G10H000100  
G10H000138 G10H000100 G10H000100 G10H000138**Current IPC-R:**

	invention	additional
<b>Advanced</b>	G10H000138 20060101	
	G10H000100 20060101	

Core	invention	additional
	G10H000138 20060101	
	G10H000100 20060101	

**Priority:**

JP1990224255A 19900828

**Patents Cited:**

→ JP57115596 A 19820719 ROBAATO DEI POURUSON [0]

**Patents Citing This One:**

→ JP3921817 B2 20070530

For further information, please contact:

[Tech Support](#) | [Billing](#) | [Sales](#)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 Q 1/68	Z N A	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 R 1:44			
1:01)			

請求項の数39 (全 55 頁)

(21) 出願番号	特願平3-508127	(73) 特許権者	999999999 エヌ・バー・イノヘネティクス・エス・ アー ベルギー国、バー—9710・ヘント、ボツ クス・4、インドウストリーバルク・ズ ベイナルデ・7
(86) (22) 出願日	平成3年4月18日 (1991. 4. 18)	(72) 発明者	ロツサウ, リュディ ベルギー国、バー—2070・エケレン、ウ イルヘフーベストラート・45
(65) 公表番号	特表平5-504889	(74) 代理人	999999999 弁理士 川口 義雄 (外 3 名)
(43) 公表日	平成5年7月29日 (1993. 7. 29)	合議体	
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 1 / 0 0 7 4 3	審判長	佐伯 裕子
(87) 国際公開番号	W O 9 1 / 1 6 4 5 4	審判官	藤田 節
(87) 国際公開日	平成3年10月31日 (1991. 10. 31)	審判官	眞壽田 順啓
審査請求日	平成5年1月18日 (1993. 1. 18)		
審判番号	平7-26368		
審判請求日	平成7年12月4日 (1995. 12. 4)		
(31) 優先権主張番号	9 0 4 0 1 0 5 4, 3		
(32) 優先日	平成2年4月18日 (1990. 4. 18)		
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 16S 及び23S rRNA 遺伝子間のスパーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーションプローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出すべき細菌種の16Sおよび23SrRNA遺伝子間の転写スパーサー領域の約15〜約100連続ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド配列から構成され、tRNA遺伝子配列を含まないプローブを用いて細菌種を特異的に検出する方法であって、16S及び23SrRNA遺伝子の3'末端及び5'末端の保存領域に割り当てられたプライマーを使用して標的部位を酵素増幅し、前記プローブを前記増幅標的部位へハイブリダイゼーションさせる工程を含む方法。

【請求項2】 前記オリゴヌクレオチド配列が、

検出すべき生物の16Sおよび23SrRNA遺伝子間のスパーサー領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のスパーサー領域配列と比較し、  
検出すべき生物の16Sおよび23SrRNA遺伝子間のスパーサー領域の約15〜約100の連続ヌクレオチドの配列であって、最近隣種のうちの少なくとも1種のスパーサー領域配列との間に少なくとも1つのミスマッチを有するヌクレオチド配列を選択することにより、選択される請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ー核酸グループ：グループ NGI1:

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC	NGI1
GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG	NGI11C
GCGAAGUAGA AUAACGACGC AUCG	NGI11CR
CGAUGCUGUC UUAUUCUACU UCGC	NGI1R

グループ NGI2:

TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NGI2
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA	NGI21C
GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA	NGI21CR
UUGGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC	NGI2R

グループ NM11:

GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG	NM11
CAGGGCGACG TCACACTTGA CC	NM111C
CAGGGCGACG UCACACUUGA CC	NM111CR
GGUCAAGUGU GACGUCGCCC UG	NM11R

グループ NM12:

GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC	NM12
GACGTACAC TTAGCAAGA AC	NM121C
GACGUCACAC UUGACCAAGA AC	NM121CR
GUUCUUGGUC AAGUGUGACG UC	NM12R

グループ NM13:

GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NM13
GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NM131C
GCACAGUAGA UAGCUAUAAC GAACGC	NM131CR
GCGUUCGUUA UAGCUAUCUA CUGUGC	NM13R

グループ NM14:

TGCGTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NM14
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NM141C
UGCACAGUAG AUAGCAAUAU CGAACGCA	NM141CR
UGCGUUCGAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA	NM14R

グループ NM15:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT	
	NM15
AATGGAACAGAATCCATTTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA	
	NM151C
AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA	
	NM151CR
UUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCUGAAUGGAUUCUGUCCAUU	
	NM15R

グループ NM16:

TTTGCCTAAC ATTCGGTTGA CTAGAACATC AGAC	NM16
GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA	NM161C
GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA	NM161CR
UUUGCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC	NM16R

グループ HD11:

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG	HD11
CAATATGCCT CGCGCATAAT AA	HD111C
CAAU AUGCCU CGCGCAUAAU AA	HD111CR
UUUU AUGCG CGAGGCAUUAU UG	HD11R

グループ BC11:

TTAAACATCT TACCAAG	BC11
CTTTGGTAAG ATGTTAA	BC111C
CUUUGGUAAG AUGUUAA	BC111CR
UUAAACAUCU UACCAAG	BC11R

グループ BC12:

TTGATGTTA AACTTGCTTG GTGGA	BC12
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BC121C
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC121CR
UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA	BC12R

グループ BP11:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BP11
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG	BP111C
AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG	BP111CR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU	BP11R

グループ HI11:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT	HI11
AAGTGC GGTC AATTGTGATGC GT	HI111C
AAGUGCGGUC AAUUGAUGC GU	HI111CR
ACGCAUCAAA UUGACCGCAC UU	HI11R

グループ HI12:

ACTTTGAAGT GAAAAC TTAA AG	HI12
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT	HI121C
CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GU	HI121CR
ACUUUGAAGU GAAAACUAAA AG	HI12R

グループ SA11:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SA11
AACAATTTGA ACCTTTCGAT T	SA111C
AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U	SA111CR
AAUCGAAAGG UUCAAAUUGU U	SA11R

グループ SA12:

GGAAACCTGC CATTTCGGTC TT	SA12
AAGACGCAAA TGCGAGGTTT CC	SA121C
AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC	SA121CR
GGAAACCGUC CAUUGCGUC UU	SA12R

グループ SA13:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TG TAGAA	SA13
TTCTACAATC TATTCTAGA TCGTGGA	SA131C
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCGUGGA	SA131CR
UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA	SA13R

グループ SAI4:

TCTAGTTTTA AAGAACTAG GTT	SAI4
AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA	SAI4IC
AACCUAGUUU CUUAAAAACU AGA	SAI4ICR
UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUV	SAI4R

グループ SPI1:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA	SPI1
TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC	SPI1IC
UGCAUUAUCU GGUGAUCUCU CAC	SPI1ICR
GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA	SPI1R

グループ SPI2:

AGGAACTGCG CATTGGTCTT	SPI2
AAGACCAATG CGCAGTTCCT	SPI2IC
AAGACCAAUG CGCAGUCCU	SPI2ICR
AGGAACUGCG CAUUGGUCUU	SPI2R

グループ SPI3:

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA	SPI3
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	SPI3IC
UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC	SPI3ICR
GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA	SPI3R

から選択される検出すべき細菌種の16Sおよび23S rRNA遺伝子間の転写スペーサー領域の核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含み、tRNA遺伝子配列を含まないことを特徴と

するプローブ。

【請求項4】 1種以上のNeisseria gonorrhoeae株を検出するためのプローブであって、

ー核酸グループ:

グループ NG11:

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC	NG11
GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG	NG11IC
GCGAAGUAGA AUAACGACGC AUCG	NG11ICR
CGAUGCGUCG UUAUUCUACU UCGC	NG11R

グループ NG12:

TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NG12
GTTCGTTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA	NG121C
GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA	NG121CR
UUUGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAAC AAAC	NG12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項5】生物学的サンプル中で *Neisseria gonorrhoeae* 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応法を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る *Neisseria gonorrhoeae* 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項4に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る *Neisseria gonorrhoeae* 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項6】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項4に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約50℃の範囲及び/又は洗浄温度が約50℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が夫々、

CGCAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

HT及び/又はWT: 50℃、

GUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA

HT及び/又はWT: 50℃であることを特徴とする請求項5

に記載の生物学的サンプル中で *Neisseria gonorrhoeae* を検出するための方法。

【請求項7】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全ての *Neisseria gonorrhoeae* 株を *in vitro* 検出するためのキットであって、

一請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数の、好ましくは全ての *Neisseria gonorrhoeae* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が *Neisseria gonorrhoeae* に対して特異的であり且つ請求項4に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

一これらのプローブと *Neisseria gonorrhoeae* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと *Neisseria gonorrhoeae* 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項8】1種以上の *Neisseria meningitidis* 株を検出するためのプローブであって、



ー核酸グループ：

グループ NM11:

GGTCAAGTGT GACGTGCCCC TG	NM11
CAGGGCGACG TCACACTTGA CC	NM111C
CAGGGCGACG UCACACUUGA C	NM111CR
GGUCAAGUGU GACGUCGCCC UG	NM11R

グループ NM12:

GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC	NM12
GACGTCACAC TTGACCAAGA AC	NM121C
GACGUCACAC UUGACCAAGA AC	NM121CR
GUUCUUGGUC AAGUGUGACG UC	NM12R

グループ NM13:

GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NM13
GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NM131C
GCACAGUAGA UAGCUAAAC GAACGC	NM131CR
GCGUUCGUUA UAGCUAUUA CUGUGC	NM13R

グループ NM14:

TGCGTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NM14
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NM141C
UGCACAGUAG AUAGCAAUAU CGAACGCA	NM141CR
UGCGUUCGAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA	NM14R

グループ NM15:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT	NM15
AATGGAACAGAATCCATTGAGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA	NM151C
AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA	NM151CR
UUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCUGAAUGGAUUCUGUCCAUU	NM15R

# グループ NM16:

TTTGCTTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC	NM16
GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA	NM16IC
GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUVAG CAAA	NM16ICR
UUUUGCCUAC AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC	NM16R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項9】生物学的サンプル中で*Neisseria meningitidis*株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る*Neisseria meningitidis*株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項8に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る*Neisseria meningitidis*株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブと間でヘアブリッドが形成された場合にこれを検出する段階を含むことを特徴とする方法。

【請求項10】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Picoll、0.02%ウシ血清アル

ブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項8に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40～58℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40～58℃の範囲に適宜調整され、特に、前記標的配列と対応する該ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が次々、

CAGGGCGACG TCACACTTGA CC

HT及び/又はWT:45℃、

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

HT及び/又はWT:45℃、

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC

HT及び/又はWT:40℃、

TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA

HT及び/又はWT:48℃、

TTTGTCTCTGGTCAAGGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

HT及び/又はWT:58℃、

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA

HT及び/又はWT:50℃であることを特徴とする請求項9に記載の生物学的サンプル中で*Neisseria meningitidis*株を検出するための方法。

【請求項11】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全ての*Neisseria meningitidis*株をin vitro検出するためのキットであって、一請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数の、好ましくは全ての*Neisseria meningitidis*株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたヘアブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種が*Neisseri*

a meningitidisに対して特異的であり且つ請求項8に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、一これらのプローブと*Neisseria meningitidis*株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたヘアブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一固体支持体に固定された請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと*Neisseria meningitidis*株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

### ー核酸グループ：

#### グループ HD11：

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG	HD11
CAATATGCCT CGCGCATAAT AA	HD11IC
CAAAUAGCCU CGCGCAUAAU AA	HD11ICR
UUUUAUAGCG CGAGGCAUUAU UG	HD11R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項13】生物学的サンプル中でHaemophilus ducreyi株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るHaemophilus ducreyi株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項12に記載のプローブと接触する段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus ducreyi株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項14】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC＝0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Pico11、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項12に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が、た、

#### CAATATGCCT CGCGCATAAT AA

HT及び/又はWT:40℃であることを特徴とする請求項13に記載の生物学的サンプル中でHaemophilus ducreyiを

【請求項12】1種以上のHaemophilus ducreyi株を検出するためのプローブであって、

検出するための方法。

【請求項15】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのHaemophilus ducreyi株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がHaemophilus ducreyiに対して特異的であり且つ請求項12に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー固体支持体に固定された請求項12に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ー該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

ー酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項16】1種以上のBranhamella catarrhalis株を検出するためのプローブであって、

ー核酸グループ：

グループ BC11:

TAAACATCT TACCAAG	BC11
CTTGGTAAG ATGTTAA	BC11IC
CUUUGGUAAG AUGUUAA	BC11ICR
UUAAACAUCU UACCAAG	BC11R

グループ BC12:

TGTATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA	BC12
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BC12IC
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC12ICR
UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA	BC12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項17】生物学的サンプル中でBranhamella catarrhalis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るBranhamella catarrhalis株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項16に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るBranhamella catarrhalis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項18】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Pico11、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項16に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30〜42℃の範囲及び/又は洗浄温度が約30〜42℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び/又は洗浄温度 (WT) が次々、

CTTGGTAAG ATGTTAA

HT及び/又はWT:30℃

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

HT及び/又はWT:42℃であることを特徴とする請求項17に記載の生物学的サンプル中でBranhamella catarrhalis株を検出するための方法。

【請求項19】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのBranhamella catarrhalis株をin vitro検出するためのキットであって、

一請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数の、好ましくは全てのBranhamella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBranhamella catarrhalisに対して特異的であり且つ請求項16に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

一これらのプローブとBranhamella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一固体支持体に固定された請求項16に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素

的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとBranhamella catarrhalis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

## 一核酸グループ：

### グループ BP11：

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG

AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG

CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU

BP11

BP11IC

BP11ICR

BP11R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項21】生物学的サンプル中でBordetella pertussis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るBordetella pertussis株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項20に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るBordetella pertussis株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイゼーションするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項22】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%ポリエチレングリコール、0.02%Pico11、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%ポリエチレングリコールを含有しており、使用されるプローブが請求項20に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び／又は洗浄温度が約55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG

HT及び／又はWT:55℃であることを特徴とする請求項21

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項20】1種以上のBordetella pertussis株を検出するためのプローブであって、

に記載の生物学的サンプル中でBordetella pertussis株を検出するための方法。

【請求項23】生物学的サンプル中で多数、好ましくは全Bordetella pertussis株をin vitro検出するためのキットであって、

一請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数の、好ましくは全てのBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がBordetella pertussisに対して特異的であり且つ請求項20に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

一これらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一固体支持体に固定された請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項24】1種以上のHaemophilus influenzae株

を検出するためのプローブであって、

ー核酸グループ：

グループHII1:

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT	HII1
AAGTGC GGTC AATTGTATGC GT	HII11C
AAGUGCGGUC AAUUGAUGC GU	HII11CR
ACGCAUCAA UUGACCGCAC U	HII1R

グループHII2:

ACTTTGAAGT GAAACTTAA AG	HII2
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT	HII21C
CUUUAAGUUU UCACUCAA GU	HII21CR

ACUUGAAGU GAAACUUA AG	HII2R
-----------------------	-------

AAGTGC GGTC AATTGTATGC GT

HT及び/又はWT:55℃、

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT

HT及び/又はWT:35℃であることを特徴とする請求項25に記載の生物学的サンプル中でHaemophilus influenzaeを検出するための方法。

【請求項27】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのHaemophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットであって、

ー請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブと多数の、好ましくは全てのHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
ー同一核酸分子を標的とし、少なくとも1種がHaemophilus influenzaeに対して特異的であり且つ請求項24に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
ー固体支持体に固定された請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項25】生物学的サンプル中でHaemophilus influenzae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用し増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項24に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るHaemophilus influenzae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項26】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC（1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Pico11、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35〜55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35〜55℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

一該プローブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
一酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分

# ー核酸グループ：

## グループ SPI1:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA

SPI1

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

SPI11C

UGCAUUACUU GGUGAUCUCU CAC

SPI11CR

GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA

SPI1R

## グループ SPI2:

AGGAACTGCG CATTGGTCTT

SPI2

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

SPI21C

AAGACCAUUG CGCAGUUCUU

SPI21CR

AGGAACUGCG CAUUGGUCUU

SPI2R

## グループ SPI3:

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA

SPI3

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

SPI31C

UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC

SPI31CR

GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA

SPI3R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項29】生物学的サンプル中でStreptococcus pneumoniae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキンゲンする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸（DNA又はRNA）を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るStreptococcus pneumoniae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項28に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るStreptococcus pneumoniae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項30】ハイブリダイゼーション媒体が、約3×

と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項28】1種以上のStreptococcus pneumoniae株を検出するためのプローブであって、

SSC（1×SSC＝0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び／又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項28に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲及び／又は洗浄温度が約45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度（HT）及び洗浄温度（WT）が夫々、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

HT及び／又はWT:45℃、

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

HT及び／又はWT:45℃、

# TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

HT及び/又はWT:45℃であることを特徴とする請求項29に記載の生物学的サンプル中でStreptococcus pneumoniaeを検出するための方法。

【請求項31】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのStreptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのキットであって、

一請求項28に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

一これらのプロープと多数の、好ましくは全てのStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がStreptococcus pneumoniaeに対して特異的であり且つ請求項28に記載のプロープのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプロープと、

一これらのプロープとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
一固体支持体に固定された請求項28に記載のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

一該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプロープとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項32】1種以上のStreptococcus agalactiae株を検出するためのプロープであって、

## 一核酸グループ：

### グループ SAI1:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SAI1
AACAATTGGA ACCTTTTCGAT T	SAI11C
AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U	SAI11CR
AAUCGAAAGG UUCAAAUUGU U	SAI1R

### グループ SAI2:

GGAAACCTGC CATTGCGTC TT	SAI2
AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC	SAI21C
AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC	SAI21CR
GGAAACCGUC CAUUUGCGUC UU	SAI2R

### グループ SAI3:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TGTAGAA	SAI3
TTCTACAATC TATTTC7AGA TCGTGG	SAI31C
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCGUGGA	SAI31CR
UCCACGAUCU AGAAUAGAU UGUAGAA	SAI3R



グループ SA14:

TCTAGTTTAA AAGAACTAG GTT

AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA

AACCUAGUUU CUUUAACU GUA

UCUAGUUUUU AAGAAACUAG GUU

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数の連続したヌクレオチドを含む配列を含むことを特徴とするプローブ。

【請求項33】 生物学的サンプル中でStreptococcus agalactiae株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列にフランキングする2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るStreptococcus agalactiae株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項32に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るStreptococcus agalactiae株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイゼーションするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

【請求項34】 ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Picoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項32に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約35〜45℃の範囲及び/又は洗浄温度が約35〜45℃の範囲に適宜調節され、特に、前記標的配列と対応する該ハイブリダイゼーション温度 (HT) 及び洗浄温度 (WT) が夫々、

AACAATTGA ACCTTCGAT T

HT及び/又はWT:35℃、

AAGACGCAAA TGCGAGGTTT CC

HT及び/又はWT:45℃、

TTCTACAATC TATTCTAGA TCGTGGG

HT及び/又はWT:45℃、

AACCTAGTTT CTTTAAACT AGA

SA14

SA14IC

SA14ICR

SA14R

HT及び/又はWT:37であることを特徴とする請求項33に記載の生物学的サンプル中でStreptococcus agalactiae株を検出するための方法。

【請求項35】 生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのStreptococcus agalactiae株をin vitro検出するためのキットであって、

一請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一これらのプローブと多数の、好ましくは全てのStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がStreptococcus agalactiaeに対して特異的であり且つ請求項32に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

一これらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

一固体支持体に固定された請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項36】 生物学的サンプル中でCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法であって、プローブの標的配列にフランキングする2種のプライマーを介するポリメラーゼ連鎖反応を応用して増幅させた検出すべき株の核酸 (DNA又はRNA) を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションでき

るようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得るCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのプローブであって、プローブが適切な条件でCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及び/又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のDNA及び/又はRNAとはハイブリダイズしないという条件下で、図10に示す16S-23S rRNAスペーサー配列から選択される15〜最大数の連続したクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得るCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項37】生物学的サンプル中で多数の、好ましくは全てのCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vitro検出するためのキットであって、  
-1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのプローブであって、プローブが適切な条件でCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及び/又はRNAのみとハイブリダイズし、他の生物由来のDNA及び/又はRNAとはハイブリダイズしないという条件下で、図10に示す16S-23S rRNAスペーサー配列から選択される15〜最大数の連続したクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
-これらのプローブと多数、好ましくは全Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
-同一核酸分子を標的にし、少なくとも1種がCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliに対して特異的であり且つ前記プローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、  
-これらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は  
-固相支持体に固定された前記プローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、  
-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素

的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

【請求項38】検出すべき微生物に特異的な請求項3、4、8、12、16、20、24、28及び32のいずれか一項に記載のプローブを使用して生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するための方法であって、好ましくはプローブ領域にフランキングする少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（標的配列を含む）DNA及び/又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のプローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプローブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出することを特徴とする方法。

【請求項39】生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するためのキットであって、  
-検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした請求項3、4、8、12、16、20、24、28及び32のいずれか一項に記載のプローブの少なくとも1種と、  
-該プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
-酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと検出すべき微生物のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
-前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

#### 【発明の詳細な説明】

本発明は、ハイブリダイゼーション手順により生物学的サンプル中で非ウイルス微生物の特異的検出に使用するための、リボソームリガ核酸（rRNA）遺伝子、特に16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される核酸プローブに係る。

ここ10年間に多数の微生物で目覚ましい進歩が遂げられているが、現在使用されている診断手順はまだ手間がかかり、非感受性であり、非特異的である。これらの欠点の多くは核酸プローブを使用することにより解決することができる。これらの核酸プローブの例としては、全ゲノムデオキシリガ核酸（DNA）、プラスミド、リボ

ロープ又は合成オリゴヌクレオチドを挙げることができ、これらのプローブは生物学的サンプル中に存在するゲノムDNA、メッセンジャーRNA又は安定RNA種を標的にすることができる。必ずしもそうでなくてもよいが、合成オリゴヌクレオチドを使用すると好適である。オリゴヌクレオチドは化学的方法を使用して迅速に大量に合成することができ、貯蔵寿命が長く、容易に精製及び標識できる。

DNAプローブ技術を使用して微生物を確実に診断するためには、使用されるプローブは高特異性（即ち他の生物に由来する核酸と交差反応すべきでない）且つ高感度（即ち検出しようとする生物の全部ではないとしてもほとんどの株がプローブと反応すべきである）であるべきである。従って、好適標的配列は以下の特徴を有するべきである。

(i) 配列は該当生物の各株のゲノム中に存在すべきである。

(ii) 進化による配列の相違は、一方では該当種を他の密接に関連する種から区別できるようにするために十分な配列相違があり、他方では使用されるプローブで該当種の全株を検出できるようにするために十分な配列保存があるように構成されるべきである。

種特異的プローブは多数の生物について記載されている。最近の文献ではTenover, Clin. Microbiol. Rev. 1:82-101, 1988を参照されたい。

しかしながら、ゲノム中のどの遺伝子から特異的プローブ配列を誘導できるのかについては不明である。プローブ開発にあたっては、最終的に対象生物に対して特異的になるようなフラグメントを得るために大規模な選択手順に従わなければならないことが多かった (Korolik et al., J. Gen. Microbiol. 134:521-529, 1988; Grimon t et al., J. Clin. Microbiol. 21:431-437, 1985; Welch et al., Nucl. Acids Res. 14:10027-10044, 1986; Donegan et al., Mol. Cell. Probes 3:13-26, 1989; Beaulieu and ROY, Abstract nr D249, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 1989)。ほとんどの場合、特異的フラグメントが誘導される遺伝子の機能又は実態は解明されておらず、別の特異的プローブが所望される毎にスクリーニング手順を手探りで繰り返さなければならない。上記基準を満たし且つ偏在する遺伝子が厳密に同定されるならば、時間と手間のかかる選択が不要になる。

16S又は23SrRNA遺伝子は、既に記載されている方法を使用して配列を容易に得ることができ、種特異的検出に使用可能なこれらの高保存性遺伝子内に種々の領域が存在することが知られているので、プローブ開発に頻用されている。しかしながら、生物によっては進化による核酸配列保存性が非常に高いため、例えば16S及び23SrRNA遺伝子から高特異性で高感度のプローブを誘導できない場合がある。更に、これらの遺伝子の保存性の結果、標

的配列のみで1又は少数のミスマッチに基づいて2種の生物を区別しなければならないことが多くなり、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーが必要になる。これらの条件から少しでも外れると、誤認の恐れがある。

従って、16S及び23SrRNA遺伝子から特異的プローブを誘導することができなかった種を含むほとんどの生物に種特異的なプローブを開発することができ、好ましくはより広いストリンジエンシー範囲を有する偏在遺伝子特徴付けることができるとは非常に有利である。

各細胞生物は、その転写物がリボソームの機能とタンパク質の合成とに不可欠であるため、リボソームRNAシストロンを有する。一般に、遺伝子はゲノム中に多重コピー存在する。真正細菌では16SrRNA遺伝子 [小サブユニットrRNA (srRNA) に同じ] はrRNAシストロンの5'末端に位置し、23SrRNA [大サブユニットrRNA (1rRNA) に同じ] が後続する。5SrRNA遺伝子はシストロンの3'末端に位置する。16S、23S及び5S遺伝子はスペーサー領域により分離され、これらのスペーサー領域には転写後プロセッシングに関与する転移RNA (tRNA) 遺伝子及びシグナル配列が位置し得る。まず最初にrRNAシストロンは前駆物質RNA分子として転写される。この一次転写物はエンドリボヌクレアーゼ及びエキソリボヌクレアーゼにより更にプロセッシングされ、成熟産物を生成する。従って、スペーサー領域配列は生物のゲノム中のみに存在するのではなく、前駆体RNA分子及びプロセッシング産物中にも存在する。真正細菌rRNAシストロンの構造及びプロセッシングは、Gegenheimer and Apirion, Microbiol. Rev. 45:502-541, 1981に詳細に記載されている。

真核生物の核ゲノム中の状況は多少異なり、srRNA及び1rRNA間に5.8SrRNA遺伝子が位置しており、5SrRNA遺伝子は別個の長いタンデムアレー中に配置されている (Perry, Annu. Rev. Biochem. 45:605-629, 1976; Long and Dawid, Annu. Rev. Biochem. 49:727-764, 1980)。しかしながら、真核生物のミトコンドリア又はクロロプラスト中のrRNAシストロンは実際に原核生物である (Borst and Grivell, Nature 290:443-444, 1981)。

文献には非常に少数の真核又は原核生物のスペーサー領域の核酸配列しか記載されていない (例えばYoung et al., J. Biol. Chem. 254:3264-3271, 1979;及びMartens et al., System. Appl. Microbiol. 9:224-239, 1987)。これらのデータから核酸配列保存を確実に予想することはできず、従って、特異的プローブの選別のためにスペーサー領域の適応については全く推定することができない。

より詳細には、真核生物に関して、生物学的サンプル中で微生物の検出に使用され、16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるハイブリダイゼーションプローブは未だに報告されていない。真核生物の大小サブユニットrRNA遺伝子間の対応するスペーサー領域に

についても何ら解明されていない。

真核生物に関する限り、リボソーム遺伝子スペーサーからクロニングされたフラグメントの使用がLeishmaniaに関する分類学的研究に記載されている(Ramirez and Guevara, Mol. Biochem. Parasitol. 22:177-183, 1987)。しかしながら、使用された領域及び研究のアプローチは、特に以下に述べる理由により、rRNA及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるプローブを使用するために当業者には無益である。

(i) Ramirez及びGuevaraにより使用されたリボソーム遺伝子スペーサーはsrRNA及び16S rRNA間のスペーサー領域ではなく、2つの隣接するrRNAシストロン間に存在する配列であり、このようなスペーサーは真核生物ではrRNAシストロンの反復単位間には見いだされず、srRNA及び16S rRNA遺伝子間の内部スペーサーには無関係である。

(ii) 遺伝子スペーサーフラグメントを使用するLeishmania分類群間の区別は、制御フラグメントパターンを比較することにより得られ、使用されるフラグメントは非特異的である。

従って、サザンブロット分析を用いず簡単にハイブリダイゼーションプロトコルを使用してフラグメントで区別することは不可能である。

リボソーム遺伝子スペーサー中に高特異的のプローブが存在し得るということも立証されていない。

従って、本発明の目的は、細菌種のような特定生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導される種特異的のプローブを提供することである。

本発明の別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23S rRNAスペーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。

本発明の更に別の目的は、ドットスポット、顕置換、コンパレーション、サンドイッチ又は逆ハイブリダイゼーション試験のようなハイブリダイゼーション試験により生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための、16S-23S rRNA遺伝子スペーサー領域から誘導されるDNAプローブを提供することである。本発明の更に別の目的は、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni及びCfa

mpylobacter coli株のin vitro診断用プローブ及び簡単な診断方法を提供することである。

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定には細菌のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

本発明はより詳細には、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定には細菌のrRNA遺伝子間、特に16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域の約15ヌクレオチド〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくはスペーサー領域の約15〜約100ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

以下の文中で「スペーサー領域」なる用語は、rRNA遺伝子間、より特定には16S及び23S rRNA遺伝子間のスペーサー領域を意味する。

本発明は、検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定には細菌に固有であるように選択されたrRNA遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用プローブに係り、rRNA遺伝子間のスペーサー領域の前記配列は、

＊目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列を、最近隣種のrRNA遺伝子間のスペーサー領域のヌクレオチド配列と比較し、

＊最近隣種のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくはスペーサー領域の約15〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドの配列を選択することにより、又は

＊短縮スペーサー領域を得るように、目的生物のスペーサー領域からrRNA遺伝子及び結合によりシグナル配列を欠失させ、

＊少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15〜スペーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約15〜約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸 (DNA及び/又はRNA) と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試験錯誤により決定することにより選択される。

本発明は特に、rRNA遺伝子間のスペーサー領域が16S rRNA遺伝子及び23S rRNA遺伝子間の転写スペーサー領域であるようなプローブに係る。

追って概説するように、数種の微生物のスペーサー領域をクロニングし、配列決定及び比較した。比較の結果、スペーサー領域の核酸配列は高保存性のrRNA遺伝子に比較して半保存性 (semi-conserved nature) であることが判明した。従って、スペーサー領域はrRNA遺伝子それ自体よりもプローブの開発に好適である。図1、2及び10は、高度に関連する生物 (例えば同一遺伝種からの高度に関連する株) 間に関連の配列相同性があること

を示す。図3及び7に示すように、並の関連性を有する生物間では多少大きい配列相違が認められた。図4～6に示すように、関連性の低い種間では顕著な配列相違性は(tRNA配列を除き)全くないことが判明した。

下記表では、異なる株の16SrRNA配列の相間値(16S hom)(配列相間%)を、スペーサー領域の対応する相

間値(スペーサーhom)に比較した。相間値(16S hom及びスペーサーhom)は、Intelligentics Inc.及びGen ofit SA製PC Geneソフトウェア(1989年4月20日リリース6.01)を使用して計算した。比較したヌクレオチドの総数を括弧内に示す。この結果から明らかなように、スペーサー領域は16SrRNA分子よりも低保存性である。

比較株		16S	スペーサー
株1	株2	hom	hom
<u>N. gonorrhoeae</u>	<u>N. gonorrhoeae</u>	99.9%	100%
NCTC 8375	ITG 4367	(1434)	(335)
<u>B. pertussis</u>	<u>B. bronchiseptica</u>	100%	98.1%
ATCC 10380	NCTC 452	(417)	(582)
<u>N. gonorrhoeae</u>	<u>N. meningitidis</u>	99%	93.5%
NCTC 8375	NCTC 10025	(1452)	(603)
<u>B. catarrhalis</u>	<u>M. nonliquefaciens</u>	97.9%	87.1%
ITG 4197	ATCC 19975	(1244)	(498)
<u>B. pertussis</u>	<u>N. gonorrhoeae</u>	86.3%	58.4%
ATCC 10380	NCTC 8375	(998)	(582)
<u>B. catarrhalis</u>	<u>N. gonorrhoeae</u>	83.8%	68.1%
ITG 4197	NCTC 8375	(1485)	(498)
<u>H. ducreyi</u>	<u>E. coli</u>	88.3%	67.1%
CIP 541		(1498)	(346)

この結果、関連する対象病原種(即ちNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Campylobacter jejuni

及びCampylobacter coli株)のスペーサー領域配列から種特異性及び感度の高いプローブを誘導することができた。16S及び/又は23SrRNA分子中で高特異性プローブを見いだすことができなかったNeisseria meningitidis及びBordetella pertussis種のスペーサー領域からも

有用なプローブを誘導することができた。本明細書に記載する以外の種（例えば他のCampylobacter種、他のHaemophilus種、Actinobacillus種、Bacteroides種、chlamydia種等）の特異的プローブも同様にスパーサー領域配列から誘導できる。

16S及び23S rRNA遺伝子間の転写スパーサー領域から誘導されるプローブの標的は、検出すべき細胞中に存在するゲノムDNA及び前駆体RNA分子である。前駆体RNA分子は一本鎖であり、多重コピー存在し得るので、前駆体RNA分子を検出すると有利である。他方、DNA分子はRNA分子よりも酵素分解を非常に受けにくい。従って、ハイブリダイゼーション前にRNA分解を生じないように十分に生物学的サンプルを処理及び/又は保存できない場合には、DNAターゲットングが好適である。

16S-23S rRNA転写スパーサー領域から誘導されるプローブの別の利点は、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）を使用する酵素増幅後に標的検出する点にある。多くの微生物のスパーサー領域は例えば、夫々16S及び23S rRNA遺伝子

の3'末端及び5'末端の保存領域に割り当てられた同一プライマーを使用し得る酵素的に増幅され得る。rRNA遺伝子の高保存性を利用すると、同一試薬及びプロトコルを使用し得ることは同時に多数の生物のスパーサー領域を増幅し、その後、該当生物のスパーサー領域に特異的にターゲットングするプローブを使用し得る増幅フラグメントを検出することができる。同時に増幅されたフラグメントの同時且つ特異的検出のために有利な方法は、逆ハイブリダイゼーションである。

スパーサー領域は保存配列により交叉されているので、この領域をPCR技術によりクローニング及び配列決定するのは簡単であり、同一プロトコルを多種の生物に適用することができる。従ってスパーサー領域の配列は、16S又は23S rRNAに割り当てられた保存プライマーを使用するrRNA遺伝子の酵素的増幅により得られる。スパーサー領域を占めるフラグメントの増幅に使用可能な塩基プライマー対の例を以下に挙げる。

プライマー対1：TGGCTCAGAT TGAACGCTGG CGGC及び

CCTTCCCTC ACGGTACTGG T

プライマー対2：TGGGTGAAGT CGTAACAAGG TA及び

CACGTCCTTC CTCGCTC。

増幅したフラグメントをそのまま、又は固有制限部位を認識する制限酵素で消化後に2つのサブフラグメントとしてクローニングすることができる。M13 PCR産物をクローニングするためのストラテジーは、Medlin et al. (Gene 71:491-499, 1988)に記載されている。

同一ストラテジーを使用してプラスミドベクターでクローニングすることができる。このアプローチによると、塩基プライマーの5'末端から固有制限部位を含むヌクレオチド配列を伸長させ、フラグメントを順方向にクローニングする。プラスミドベクターにクローニング後、ジデオキシシチュエーションミネーション法を使用しスパーサー領域を配列決定することができる。

このアプローチはゲノムバンク又は選択された制限エンドヌクレアーゼフラグメントを使用する従来のクローニング手順に比較して著しく簡単で時間がかからない。

クローニングせずにPCRフラグメントで配列決定反応を直接実施すると、より迅速に配列情報が得られるが、クローニングフラグメントから生成された配列情報のほうがより正確且つ完全である。PCRフラグメントに比較して、クローニング遺伝子フラグメントは容易に大量複製できるので、配列決定段階を明確に読み取ることができる。プローブ配列中に1つでもミスマッチがあるとプローブは無効になるので、配列を得る際には速度よりも精度のほうが著しく優先される。

上記に要約したアプローチによりスパーサー配列を得る容易さを考慮すると、プローブが所望される生物のスパーサー領域のヌクレオチド配列を最近隣種のスパーサー領域のヌクレオチド配列と比較するのが、特異的プローブ配列を誘導するために好適な方法である。

最近隣種とは、DNA相同の点で最も密接に関連すること知られており且つ該当生物と区別されなければならない分類群を意味する。

該当成分の分類学的位置に依存して、最近隣種は該当生物に非常に高度の関連し、結合度が75%以上であってもよいし、関連度が低く、有効なDNA相同百分率を示さなくてもよい。初期再生レート法では結合度の値は約30%以下であり、固相DNA:DNAハイブリダイゼーション法ではDNA相同は更に低く、10~20%の結合度になる。

一方、該当生物を区別すべき最近隣種のヌクレオチド配列を入手できない場合には、試行錯誤により特異的プローブを選択することができる。その場合、スパーサー領域の任意の場所に位置し得る特異的プローブ領域を各生物毎に実験的に定義しなければならない。rRNA遺伝子やシグナル配列のようなスパーサー領域中のほんのわずかの領域しかプローブ領域として実験的に除外できない場合もある。しかしながら、16S-23S rRNAスパーサー領域は一般に小さく、通常900bp以下であるので、大規模にスクリーニングしなくても良好なプローブ配列を容易

に見いだすことができる。

例えば16S及び23SrRNA遺伝子間の700bpのスペーサー領域の場合、tRNA及びシグナル配列を欠失させることにより得られる「短縮」スペーサー領域は約500bpであり得る。

本明細書中に使用する「生物学的サンプル」なる用語は、該当標的配列が探査される臨床サンプル（膿、痰、血液、尿等）、環境サンプル、細菌コロニー、汚染又は純粋培養物、精製核酸等のような試料を意味する。

本明細書中に使用する「rRNA遺伝子スペーサー領域か

ら誘導」なる用語は、該当プローブがDNAフラグメントから形成されるかRNAフラグメントから形成されるかに関係なく、又はクローニングフラグメント（DNAの場合）から構成されるか又は合成オリゴヌクレオチドから構成されるかに関係なく、該当プローブがゲノム又は転写RNA分子中に通常存在するリボソームRNA遺伝子間のスペーサー領域に配置された配列とハイブリダイズすることを意味する。

*Neisseria gonorrhoeae*株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

## － 核酸 グループ：

### グループ NG11：

CGATCGCGTCG TTATTCTACT TCGC	NG11
GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG	NG11IC
GCGAAGUAGA AUAACGACGC AUCG	NG11ICR
CGAUGCGUGC UUAUUCUACU UCGC	NG11R

### グループ NG12：

TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NG12
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAG CGAA	NG12IC
GUVUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA	NG12ICR
UUGGUUUACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC	NG12R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

一、夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、  
・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

*Neisseria meningitidis*株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

－ 核 酸 グ ル ー プ ：

グ ル ー プ NMI1:

GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG	NMI1
CAGGGCGACG TCACACTTGA CC	NMI1IC
CAGGGCGACG UCACACUUGA CC	NMI1ICR
GGUCAAGUGU GACGUCCGCC UG	NMI1R

グ ル ー プ NMI2:

GTTCCTGGTC AAGTGTGACG TC	NMI2
GACGTCAAC TTAGCCAAGA AC	NMI2IC
GACGUCAAC UUGACCAAGA AC	NMI2ICR
GUUCUUGGUC AAGUGUGACG UC	NMI2R

グ ル ー プ NMI3:

GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NMI3
GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC	NMI3IC
GCACAGUAGA UAGCUAUAAC GAACGC	NMI3ICR
GCGUUCGUUA UAGCUAUCUA CUGUCC	NMI3R

グ ル ー プ NMI4:

TGCGTTGGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NMI4
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NMI4IC
UGCACAGUAG AUAGCAAUUA CGAACGCA	NMI4ICR
UGCGUUGCAU AUUGCUAUCU ACUGUGCA	NMI4R



グループ NM15:

TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTGCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

NM15

AATGGAACAGAAATCCATTTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA

NM15IC

AAUGGAACAGAAUCCAUUCACGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAAA

NM15ICR

UUUUUUUUCUUGGUAAGUGUGACGUCGCCCCUGAAUGGAUUCUGUCCAUU

NM15R

グループ NM16:

TTTGCCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC NM16

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA NM16IC

GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA NM16ICR

UUUGCCUAAU AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC NM16R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれかにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

一・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Branhamella catarrhalis株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー 核 酸 グ ル ー プ ー :

グ ル ー プ BC11:

TTAAACATCT TACCAAAAG	BC11
CTTTGGTAAG ATGTTTAA	BC11IC
CUUUGGUAAG AUGUUUAA	BC11ICR
UUAAAAUUCU UACCAAAAG	BC11R

グ ル ー プ BC12:

TTGATGTTTT AACTTGCTTG GTGGA	BC12
TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA	BC12IC
UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA	BC12ICR

UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA BC12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもブロープが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、  
・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Haemophilus ducreyi株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションブロープは、

ー 核 酸 グ ル ー プ ー :

グ ル ー プ HD11:

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG	HD11
CAATATGCCT CGCGCATAAT AA	HD11IC
CAAUUUGCCU CGCGCAUAAU AA	HD11ICR

UUUUUUGCCG CGAGGCATAU UG HD11R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもブロープが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、  
・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列

を含む。

Haemophilus influenzae株を検出するための本発明

のハイブリダイゼーションプローブは、

－ 核酸グループ：

グループH111：

ACGCATCAAA TTGACCGCAC TT	H111
AAGTGGGTC AATTTGATGC GT	H111C
AAGUGCGGUC AAUUUGAUGC GU	H111CR
ACGCAUCAAA UUGACCGCAC UU	H111R

グループH112：

ACTTTGAAGT GAAAACTTAA AG	H112
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT	H112IC
CUUUAAAGUU UCACUUCAAA CU	H112ICR
ACUUUGAAGU GAAAAUUAA AG	H112R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

一・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、  
・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Bordetella pertussis株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

－ 核酸グループ：

グループB111：

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	B111
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG	B111C
AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG	B111CR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU	B111R

から選択される核酸に属しており且つ15～選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修

飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

一・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチド

が付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列

を含む。

Streptococcus pneumoniae株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

## ー 核 酸 グ ル ー プ ：

### グ ル ー プ BPI1：

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BPI1
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG	BPI1IC
AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG	BPI1ICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU	BPI1R

### グ ル ー プ SPI2：

AGGAAGTGGC CATTGGTCTT	SPI2
AAGACCAATG CGCAGTTCTT	SPI2IC
AAGACCAAVG CGCAGUUCU	SPI2ICR
AGGAACUGCG CAUUGGUCUU	SPI2R

### グ ル ー プ SPI3：

GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA	SPI3
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	SPI3IC
UUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC	SPI3ICR
GAGUUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA	SPI3R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、  
ー、夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

Streptococcus agalactiae株を検出するための本発明のハイブリダイゼーションプローブは、

ー 核 酸 グ ル ー プ :

グ ル ー プ SAI1:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	SAI1
AACAATTTGA ACCTTTCGAT T	SAI1IC
AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U	SAI1ICR
AAUCCGAAAGG UUCAAAUUGU U	SAI1R

グ ル ー プ SAI2:

GGAACCTGC CATTTGCGTC TT	SAI2
AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC	SAI2IC
AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC	SAI2ICR
GGAACCGUC CAUUUGCGUC UU	SAI2R

グ ル ー プ SAI3:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TGTAGAA	SAI3
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGA	SAI3IC
UUCUACAAUC UAUUUCUAGA UCGUGGA	SAI3ICR
UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA	SAI3R

グ ル ー プ SAI4:

TCTAGTTTTA AAGAACTAG GTT	SAI4
AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA	SAI4IC
AACCUAGUUU CUUUAAAAACU AGA	SAI4ICR
UCUAGUUUUA AAGAAACUAG GUU	SAI4R

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修

飾配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズするという条件下で、

ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチド

が付加もしくは除去されているか、

- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を含む。

本発明は更に、適切な条件下でプローブがCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli由来のDNA及び／又はRNAと特異的にハイブリダイズするという条件下で、図10Iに示し16S-23S rRNAスペーサー配列から誘導される15-最大数のヌクレオチドの配列、又はTがUで置換された対応配列、又はその相補配列、又はTがUで置換された対応する相補配列を含むCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するためのハイブリダイゼーションプローブに係る。

グループNGI1, NGI2, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HI11, HI12, BP11, SP11, SP12, SP13, SA11, SA12, SA13及びSAI4に示した配列中、アルファベットは以下のヌクレオチドを表す。

- A: アデニン残基
- C: シチジン残基
- G: グアニン残基
- T: チミジン残基
- U: ウラシル残基。

「標的」なる用語は、上記に定義したグループNGI1, NGI2, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HI11, HI12, BP11, SP11, SP12, SP13, SA11, SA12, SA13及びSAI4の配列のいずれかに相補的な配列を意味する。

本発明のプローブが上記配列の片側又は両側に核酸延長部（例えばクロニングベクターの核酸フラグメント又は該クロニングベクターから前記プローブを切断することにより得られるリンカーフラグメント）を含む場合、このような延長部は、追って定義するような本発明の方法により試験され得る微生物のDNA中で上記標的以外の任意の対応する相補的核酸配列とハイブリダイズしないように選択されるべきである。このようなハイブリダイゼーションは寄生性であり、プローブの特異性を低下させる。好適プローブは、上記グループの配列のいずれかから形成される核酸フラグメントから構成され、該フラグメントは15〜該当該核酸配列の最大数のヌクレオチドを含む。

上記ヌクレオチド配列（及び以下に記載する他の配列）において、式の左端は常に該当該配列の5'末端に対応し、右端は3'末端に対応する。

更に「グループXのプローブ」（XはNGI1, NGI2, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HI11, HI12, BP11, SP11, SP12, SP13, SA11, SA12, SA13及びSAI4から選択される）と称するとき、このようなプローブは上記又は下記に定義するグループに属する核酸の1種に含まれる配列を有するものと理解されたい。

また、本明細書中で使用する「ヌクレオチド」なる用

語は、特に明記しない限りリボヌクレオチド及びデオキシヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド（例えばイノシン）を無差別に意味するものと理解されたい。「ヌクレオチド」なる用語は更に、修飾基（例えばハイブリダイゼーション能に根本的に影響しない化学的修飾基）を含むヌクレオチドも包含する。このような修飾基の目的は、例えば特に該当RNA又はDNA鎖（例えば他のDNA及び／又はRNAと共に生物学的サンプル中に最初に含まれているRNA又はDNA鎖）とのハイブリダイゼーション産物中から標識又はラベルされたプローブを後で検出するために適切なマーカー又はラベルと直接又は間接的に結合し易くすることである。

例えば、このような修飾基は、適切な酵素又は蛍光又は化学発光ラベルを担持する他の抗体により特異的に認識され得る抗体により認識可能である。可能な標識手順については追って詳細に説明する。

本発明は更に、上記配列のいずれかを有しており且つ上記プローブの特異性を変更しないように一部のヌクレオチドが置換したプローブにも係る。プローブは、上記グループのいずれかに属する核酸の1種又はその一部から構成される場合もあるが、その場合、プローブはNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株の遺伝材料に対する該プローブとの特異性を変えない程度までその両側にヌクレオチド延長部を含む。

従って本発明は、場合によりヌクレオチド配列に少数の些少の変異を有するほとんどのNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniaeもしくはCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliのRNA又はDNAに含まれる配列のヌクレオチド配列からなるレプリカ（数字の後にIC又はICRと記述することにより表す）、又はNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniaeもしくはCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliの天然RNA又はDNAに含まれる配列に相補的な配列（数字のみ又は数字の後にRを記述することにより表す）から形成されるプローブを提供する。

より詳細には、該当DNA中の標的配列は、このような標的に対する本発明のプローブのハイブリダイゼーション特異性に影響しないように、場合により休閒に些少な天然の変異を有するNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus

s ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter

coli株の全部ではないとしても大部分に存在する以下の連続配列のいずれかから構成される。  
Neisseria gonorrhoeaeの場合、

CCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

GTITGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA。

Neisseria meningitidisの場合、

CAGGGCGACG TCACACTTGA CC

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC

TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA

AATGGAAACAGAATCCATTTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAGAACAAAA

GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA。

Branhamella catarrhalisの場合、

CTTTGGTAAG ATGTTTAA

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA。

Haemophilus ducreyiの場合、

Bordetella pertussisの場合、

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA。

AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG。

Haemophilus influenzaeの場合、

Streptococcus agalactiaeの場合、

AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT。

Streptococcus pneumoniaeの場合、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC。

AAACAATTGGA ACCTTTTCGAT T

AAAGACGCCAAA TGGCAGGTTT CC

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGG

AACTCTAGTTT CTTTAAACT AGA.

本発明のプロープは、対応するヌクレオチド配列を含むインサートを含む組換えプラスミドをクローニングし、必要に応じて適切なヌクレアーゼを使用してクローン化プラスミドから対応するヌクレアーゼ配列を切断し、例えば分子量に従う分画により回収することにより形成される。本発明のプロープは、例えば従来のホスホートリフェス法により化学的に合成することもできる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株を検出するための方法にも係り、該方法は、必要に応じて適切な変性条件下で核酸 (DNA 又は RNA) をハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンプルを、プロープとサンプル中に存在し得る株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプロープと接触させる段階と、ハイブリッドが形成された場合にはこれを検出する段階とを含む。

本発明の方法は、該当生物を探索するサンプル中に存在する可能性のある酵母、真菌、原生動物、他の細菌株及び/又はヒト細胞から、*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* を、区別することができる。本発明の方法は、*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株をサンプル中で直接又は株を培養後に検出する方法に係る。

ハイブリッドが検出された場合、グループ NG11, NG12, NM11, NM12, NM13, NM14, NM15, NM16, BC11, BC12, HD11, HT11, HT12, BP11, SP11, SP12, SP13, SA11, SA12, SA13 及び PSA14 のプロープのいずれかの使用にて夫々 *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae* 及び

*Streptococcus pneumoniae* による感染が生物学的サンプル中に存在していたと判断することができる。

本発明の有利な実施態様によると、*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株を検出するための方法において、使用されるプロープは、生物学的サンプル中に存在し得る *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 又は *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* 株の DNA 全体及び RNA とハイブリダイズするプロープである。

ハイブリダイゼーション条件は、例えばハイブリダイゼーション温度、媒体の成分の性質及び濃度、並びに形成されるハイブリッドの洗浄温度等の数値のパラメータに依存して監視される。

ハイブリダイゼーション及び洗浄温度はプロープ (その核酸組成、種類及び長さ) に応じて上限を制限され、本発明のプロープの最高ハイブリダイゼーション又は洗浄温度は約 30~58°C である。温度がこれ以上になると、デュプレクシングはプロープと標的との間に形成されるハイブリッドの解離 (又は変性) に競合する。

好適ハイブリダイゼーション媒体は約 3 × SSC (1 × SC = 0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.

0)、約 25mM のリン酸緩衝液 pH7.1、20% 脱イオン化ホルムアミド、0.02% Ficoll、0.02% ウシ血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン及び約 0.1mg/ml の剪断変性サケ精子 DNA を含有する。

好適洗浄媒体は、約 3 × SSC、25mM リン酸緩衝液 pH7.1 及び 20% 脱イオン化ホルムアミドを含有する。他のハイブリダイゼーション又は洗浄媒体も使用できる。

しかしながら、プロープ又は媒体に変更を導入する場合、必要な特異性を得るためにプロープを使用可能な温度は、B. D. HAMES and S. J. HIGGINS, (eds.), *Nucleic acid hybridization. A practical approach*, IRL Press, Oxford, U. K., 1985 に記載されているような既知の關係に応じて変更すべきである。



この点では、一般にDNA:DNAハイブリッドはRNA:DNA又はRNA:RNAハイブリッドよりも安定性が低いことにも留意すべきである。従って、検出すべきハイブリッドの性質に依存して、特異的検出を実施できるようにハイブリダイゼーション条件を適応させるべきである。

本発明に従って、一般にNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を検出するための方法は、ハイブリダイゼーション温度を適宜調節することにより実施され得る。このような場合、より厳密な条件で洗浄する必要はない。

本発明の別の実施態様によると、ハイブリダイゼーション温度を必ずしもハイブリダイゼーションが特異的となるような値に調節する必要はなく、特に、ハイブリダイゼーションが特異的となるような値に対応する温度で洗浄を実施するのであるならば、ハイブリダイゼーションが特異的となるような温度よりも低い温度でハイブリダイゼーションを行ってもよい。

グループNG11のプロープでNeisseria gonorrhoeae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNG12のプロープでNeisseria gonorrhoeae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNM11のプロープでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNM12のプロープでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNM13のプロープでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNM14のプロープでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約48℃に調節すると適切であり、媒体は

上記に定義した類である。

グループNM15のプロープでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約58℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNM16のプロープでNeisseria meningitidis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBC11のプロープでBranhamella catarrhalis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約30℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBC12のプロープでBranhamella catarrhalis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約42℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループBP11のプロープでBordetella pertussis株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHD11のプロープでHaemophilus ducreyi株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約40℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHI11のプロープでHaemophilus influenzae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約55℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHI12のプロープでHaemophilus influenzae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSA11のプロープでStreptococcus agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約35℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSA12のプロープでStreptococcus agalactiae株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は

は上記に定義した類である。

グループSAI3のプロープで*Streptococcus agalactiae* e株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAI4のプロープで*Streptococcus agalactiae* e株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約37℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI1のプロープで*Streptococcus pneumoniae* e株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI2のプロープで*Streptococcus pneumoniae* e株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSPI3のプロープで*Streptococcus pneumoniae* e株を検出（及び他の細菌分類群から区別）するための方法の実施態様によると、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄温度は約45℃に調節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

本発明は更に*Neisseria meningitidis*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、  
—*Neisseria meningitidis*に特異的なプロープ、即ちグループNMI1、NMI2、NMI3、NMI4、NMI5又はNMI6のプロープと、  
—これらのプロープと*Neisseria meningitidis*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Neisseria gonorrhoeae*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、  
—*Neisseria gonorrhoeae*に特異的なプロープ、即ちグループNGI1又はNGI2のプロープと、  
—これらのプロープと*Neisseria gonorrhoeae*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Branhamella catarrhalis*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、  
—上記*Branhamella catarrhalis*に特異的なプロープから

選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループBCI1又はBCI2のプロープと、

—これらのプロープと*Branhamella catarrhalis*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Haemophilus ducreyi*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、  
—上記*Haemophilus ducreyi*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループBDI1のプロープと、

—これらのプロープと*Haemophilus ducreyi*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Bordetella pertussis*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、  
—上記*Bordetella pertussis*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループBP11のプロープと、

—これらのプロープと*Bordetella pertussis*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Haemophilus influenzae*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、  
—上記*Haemophilus influenzae*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループHII1又はHII2のプロープと、  
—これらのプロープと*Haemophilus influenzae*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、  
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に*Streptococcus agalactiae*株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、  
—上記*Streptococcus agalactiae*に特異的なプロープから選択された少なくとも1種のプロープ、即ちグループSAI1、SAI2、SAI3又はSAI4のプロープと、  
—これらのプロープと*Streptococcus agalactiae*株のDNA及び／又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にStreptococcus pneumoniae株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

ー上記Streptococcus pneumoniaeに特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグルーブSP11, SP12又はSP13のプローブと、

ーこれらのプローブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更にCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

ー上記Campylobacter jejuni及びCampylobacter coliに特異的なプローブから選択された少なくとも1種のプローブと、

ーこれらのプローブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を応じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のプローブは、核酸プローブを利用するアクセシの特異性を増加するサンドイッチハイブリダイゼーションシステムで使うことができる。核酸プローブに基づくアクセシにおけるサンドイッチハイブリダイゼーションの原理及び使用は更に記載されている(例えばDUNN and HASSEL, Cell, 12:23-36; 1977; RANKI et al., Gene, 21:77-85; 1983)。直接ハイブリダイゼーションアクセシは好ましい速度を有するが、サンドイッチハイブリダイゼーションは信号対雑音比が高いという点で有利である。更に、サンドイッチハイブリダイゼーションは核酸プローブに基づくアクセシの特異性を増加することができる。

適正に設計するならば、サンドイッチハイブリダイゼーションアクセシは実際に、同一生物の2種の異なる核酸部分を認識する2種のプローブを使用する場合、核酸プローブに基づく試験の特異性を最大にすることができる。満足しなければならない唯一の要件は、2種のプローブの両方が(i)標的生物の同一核酸分子にハイブリダイズし、且つ(ii)同一の非標的生物にハイブリダイズしないことである。

2種の所与のプローブI及びIIを使用する場合、サンドイッチハイブリダイゼーションシステムは次のように説明することができる。

プローブIは生物(Cでなく)A及びB由来の核酸とハイブリダイズする。

プローブIIは生物(Bでなく)A及びC由来の核酸とハイブリダイズする。

両方のプローブが標的核酸にハイブリダイズすることが絶対的に必要であるので、生物A由来の核酸がサンプル中に存在する場合のみに検出可能なシグナルが発生される。プローブの一方が検出すべき生物に特異的である場合には、他方のプローブは第1のプローブよりも同一標的分子にハイブリダイズするのであれば、特異的配列から構成しても非特異的配列から構成してもよい。

本発明のプローブは、同一標的分子にハイブリダイズする別の非特異的又は特異的のプローブと夫々組み合わせるNeisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter jejuni及びCampylobacter coliに特異的なサンドイッチハイブリダイゼーションアクセシで使うことができる。サンドイッチハイブリダイゼーションプロセスでは、標的DNA及びRNAを探索する生物学的サンプルにプローブを同時に加えてもよいし、別々に加えてもよい。

本発明は更に生物学的サンプル中でNeisseria gonorrhoeae株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアクセシ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種のNeisseria gonorrhoeaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとNeisseria gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でNeisseria meningitidis株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアクセシ用キットに係り、該キットは、

ー同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種のNeisseria meningitidisに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブとNeisseria meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でBranhamella catarrhalis株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアクセシ用キットに係り、該キット

トは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がBranhamella catarrhalisに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとBranhamella catarrhalis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でHaemophilus ducreyi株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がHaemophilus ducreyiに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとHaemophilus ducreyi株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でHaemophilus influenzae株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がHaemophilus influenzaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとHaemophilus influenzae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でBordetella pertussis株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がBordetella pertussisに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとBordetella pertussis株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でStreptococcus a

galactiae株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がStreptococcus agalactiaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でStreptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がStreptococcus pneumoniaeに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でCampylobacter jejuni株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がCampylobacter jejuniに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとCampylobacter jejuni株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中でCampylobacter coli株をin vitro検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

同一核酸分子を標的にし且つ少なくとも1種がCampylobacter coliに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

—これらのプローブとCampylobacter coli株のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のプロブは、コンペティションハイブリダイゼーションプロトコルでも使用することができる。

コンペティションハイブリダイゼーションでは、標的分子は特異的プロブとその補体との間に形成されるハイブリッドに競合する。標的数が多ければ多いほどプロブとその補体との間に形成されるハイブリッドの量は少なくなる。特異的標的が存在していたことを示す陽性シグナルは、標的を加えなかったシステムに比較してハイブリダイゼーション反応が低いことにより確認される。特定の実施態様によると、適切に標識した特異的オリゴヌクレオチドプロブを標的分子とハイブリダイズさせる。次に、混合物を受容器（例えばマイクロタイター皿のウェル）に移し、特異的プロブに相補的なオリゴヌクレオチドを固定し、ハイブリダイゼーションを続ける。洗浄後、相補的オリゴヌクレオチドとプロブとの間に形成されたハイブリッドを、使用したラベルに応じて好ましくは定量的に測定する。

本発明のオリゴヌクレオチドは、酵素的に増幅した特異的フラグメントを生成するためにポリメラーゼ鎖反応技術（PCR; Mullis and Faloona, Methods in Enzymology 155:335-350, 1987）で増幅プライマーとして及び／又は夾叉オリゴヌクレオチドプライマー間で増幅されたフラグメントを検出するためのプロブとして使用することができる。

PCRによるハイブリダイゼーションアッセイの特異性は種々のレベルに調節することができる。

増幅法又は検出法又はその両方は特異的であり得る。両方が特異的な場合は特異性が最大になるので好適である。このようなPCRを利用する高特異性試験は本発明のプロブを使用して実施され得る。

しかしながら、場合によっては、多様な生物に使用できるように増幅法を標準化するために、特異的検出に結び付けられた本発明の検出プロブを夾叉する保存性プライマーを使用する非特異的増幅法が有利である。

標準化増幅法で使用される増幅プライマーは、スーパー領域の両側の16S及び23S rRNA遺伝子の保存領域に見いだされる（実施例1参照）。

本発明は更に、検出すべき微生物に特異的な本発明のプロブのいずれかを使用して生物学的サンプルに含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するための方法にも係り、該方法によらず、好ましくはプロブ領域を夾叉する少なくとも1組のプライマーによる酵素的増幅を使用して、生物学的サンプル中に存在する（標的配列を含む）DNA及び／又はRNAを標識し、増幅した標的配列と膜上のプロブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプロブを既知の位置にドットスポットした膜に前記生成物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出する。

増幅が必要な場合、その目的は標的配列を増幅し（それによって標的配列の次領域も増幅させ）、増幅領域のみを標識することである。

生物学的サンプル中に十分な標的配列が存在する場合、増幅は不要である。

このような場合、ハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段により又は特異的染料の添加により標識を実施すべきであり、生物学的サンプル中に存在するDNA及び／又はRNA全体を標識することに留意すべきである。

本発明は更に、生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数種の微生物を同時にin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、  
—検出すべき微生物に特異的であり、膜にドットスポットした本発明のプロブの少なくとも1種と、  
—該プロブの標的配列を含むDNA及び／又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、  
—酵素的増幅が可能であり及び／又はこれらのプロブと検出すべき微生物のDNA及び／又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は緩衝衝液を生成するために必要な成分と、  
—前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

上記方法及びキットは、Saiki et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234, 1989) により記載されている逆ドットプロットアッセイのような逆ハイブリダイゼーションドットプロットアッセイを含む。

この場合、5' ビオチニル化プライマーを用いるPCRを使用して標的配列をまず酵素的に増幅する。第2段階では、固体支持体に固定した特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション後、増幅産物を検出する。この方法は実施例2に記載する変形方法のような数種の変形が考えられる。例えば、この方法はPCR及び該当生物の種々の特異的オリゴヌクレオチドプライマーをドットスポットした膜とのハイブリダイゼーション後に特定の臨床サンプル中に存在し得る種々の微生物の同時且つ特異的検出に特に有利であり得る。上記のような逆ハイブリダイゼーションアッセイで使用可能な特異的オリゴヌクレオチドプライマーの有利なパネルの例を以下に挙げる。

- (i) 痰パネル: Moraxella (Branhamella) catarrhalis  
Streptococcus pneumoniae  
Haemophilus influenzae
- (ii) CSF-パネル: Neisseria meningitidis  
Haemophilus influenzae  
Streptococcus pneumoniae
- (iii) 尿生確-パネル: Neisseria gonorrhoeae  
Haemophilus ducreyi  
Chlamydia trachomatis

# *Treponema pallidum*

当然のことながら、これらのパネルは他の臨床的に関連する微生物のプロープを加えることにより拡張することができる。背骨ポケットからのサンプル又は血液サンプルのような他の臨床サンプルのパネルも利用できる。

PCRには、非普遍的に保存されたプライマー、例えばスパーサー領域自体に配置されたプライマーも使用することができ、PCRは1組のプライマーを用いて又は同一反応容器で種々の組のプライマーを用いて実施することができる。

増幅段階なしに逆ハイブリダイゼーションを実施することもできる。この場合、サンプル中に存在する核酸をハイブリダイゼーション前に例えば化学的手段又は特異的染料の添加により特異的又は非特異的に標識又は修飾すべきである。

ほとんどの場合、スパーサー領域から誘導され得る該当生物の特異的プロープの数は、本明細書に記載するプロープに制限されない。

生物によっては、種々の細菌の高特異性且つ高感度のプロープの開発のためにスパーサー領域を利用できることが立証されているプロープは1又は2種しか記載されていない。Bordetella pertussisのみが例外であり、スパーサー領域の唯一の特定領域(Bordetella pertussis配列中のヌクレオチド271-299、図2の上位)が特異的配列を有する。しかしながら、Bordetella pertussisのスパーサー領域配列から、高度に関連するBordetella種の同時検出に有用であり得るプロープを設計することができる。Bordetella pertussis以外のBordetella種を検出するプロープも図2の配列から推定することができる。同様に、Moraxella nonliquefaciens及びHaemophilus influenzaeバイオグループaegyptiusの潜在的に特異的なプロープも夫々図7及び8に示すスパーサー配列から推定することができる。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeisseria gonorrhoeae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたNeisseria gonorrhoeaeに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、一該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとNeisseria gonorrhoeae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeisseria meningitidis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、

一固体支持体に固定されたNeisseria meningitidisに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、

一該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとNeisseria meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaemophilus ducreyi株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたHaemophilus ducreyiに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、一該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとHaemophilus ducreyi株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBranhamella catarrhalis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたBranhamella catarrhalisに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、一該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとBranhamella catarrhalis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のBordetella pertussis株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたBordetella pertussisに特異的な本発明のプロープのいずれかから選択された少なくとも1種のプロープと、一該プロープの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロープとBordetella pertussis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩

衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のHaemophilus influenzae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたHaemophilus influenzaeに特異的な本発明のプロブのいずれから選択された少なくとも1種のプロブと、一該プロブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロブとHaemophilus influenzae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStreptococcus pneumoniae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたStreptococcus pneumoniaeに特異的な本発明のプロブのいずれから選択された少なくとも1種のプロブと、一該プロブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロブとStreptococcus pneumoniae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のStreptococcus agalactiae株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたStreptococcus agalactiaeに特異的な本発明のプロブのいずれから選択された少なくとも1種のプロブと、一該プロブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロブとStreptococcus agalactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株をin vitro検出するためのキットに係り、該キットは、一固体支持体に固定されたCampylobacter jejuniに特異的な本発明のプロブのいずれから選択された少な

くとも1種のプロブと及びCampylobacter coliに特異的な本発明のプロブのいずれから選択された少なくとも1種のプロブと、

一該プロブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プロブとCampylobacter jejuni及びCampylobacter coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

プロブの使用条件  
本発明のプロブは標識すると有利である。任意の従来のラベルを使用することができる。プロブは、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 及び $^{14}\text{C}$ のような放射性トレーサーにより標識される。

放射性標識は、(標識すべき末端に応じて)放射性標識ヌクレオチド、(ホスファターゼによる脱リン酸化を伴うか又は伴わない)ポリヌクレオチドキナーゼ、末端転移酵素又はリガーゼを使用することにより、3' 又は5' 位の末端標識のような任意の従来方法に従って実施され得る。本発明のプロブの1種は、数種の放射性ヌクレオチド又は数種の放射性及び非放射性ヌクレオチドから構成される鎖の合成用マトリックスであり得る。

本発明のプロブは、1又は数種の放射性ヌクレオチドを使用する化学的合成により製造することもできる。別の放射性標識方法は本発明のプロブの化学的ヨウ素化であり、プロブに数個の $^{125}\text{I}$ 原子を結合させる。

本発明のプロブの1種が非放射性RNA又はDNAとのハイブリダイゼーションに使用するように放射性標識される場合、ハイブリダイゼーションの検出方法は、使用される放射性トレーサーに依存する。一般に、放射性トレーサーにより発生される電離性放射線を検出することが可能なオートラジオグラフィ、液体シンチレーション、 $\gamma$ 計数又は他の任意の従来方法を使用することができ。

免疫特性(例えば抗原又はハプテン)、ある種の試薬に対する特異的親和性(例えばリガンド)、検出可能な酵素反応を提供する特性(例えば酵素、補酵素、酵素基質又は酵素反応に関する基質)、又は物理的特性(例えば任意の波長の光の蛍光、発光又は吸収)を有する残基に本発明のプロブを組み合わせることににより非放射性標識を使用することもできる。プロブと標的により形成されるハイブリッドを特異的に検出する抗体も使用できる。

本発明のプロブを化学的に合成する場合には非放射性ラベルを使用することができ、アデニン、グアニン、シチジン、チミン及びウラシル残基は、プロブ又はプロブと相補的DNAもしくはRNAフラグメントとの

間に形成されたハイブリッドを検出することが可能な他の化学的残基に結合し得る。

一方、1種以上のヌクレオチドを他の化学的残基に結合することにより修飾した場合、プローブのヌクレオチド配列は本発明のプローブの1種のヌクレオチド配列と同一である。

本発明は更に、上記のように標識され且つ検出可能な本発明のプローブを使用してハイブリダイゼーションによりRNA及び/又はDNAを検出するための方法にも係る。この点では、従来のハイブリダイゼーション方法を使用することができる。

生存生物起源の細胞又はそれ自体生存生物である細胞を検出するためには、化学的又は物理的方法を使用して細胞の部分的又は全溶解によりこれらの細胞のRNA及び/又はDNAに必要に応じてアクセスできるようにし、検出可能な本発明の1又は数種のプローブと接触させる。この接触は、液体媒体又は溶液中でミセル化、セルロース又はナイロンフィルターのような適当な支持体上で実施され得る。この接触は、改善、最適又は制限条件（即ち配列が所定の分子長で完全に相同である場合にのみハイブリッド形成可能な条件）下で実施され得る。このような条件は、温度、反応物質濃度、最適核酸対合温度を低下させる物質の存在（例えばホルムアミド、ジメチルスルホキシド及び尿素）、及び反応容量を外見上低下させるか及び/又はハイブリッド形成を促進する物質の存在（例えばデキスラン硫酸、ポリエチレングリコール又はフェノール）を含む。

ハイブリダイズしなかった本発明のプローブを除去するには、適切なイオン力価及び適切な温度の緩衝溶液で洗浄し、場合により、S1スルファーゼ又は一本鎖DNAもしくはRNAを消化するが、DNA-RNAハイブリッドもしくは二本鎖DNAを消化しない他の任意の酵素で処理する。

液体媒体中で、細胞DNA又はRNAフラグメントに對合した本発明のプローブのハイブリッドは種々の方法、例えばヒドロキシアパタイト上のクロマトグラフィーにより液体媒体の残余から分離することもできる。

次に、ハイブリダイズしたプローブをプローブ上のラベルにより検出する。

染色体DNAフラグメントを標的にするためには、RNAを1又は数種の酵素で処理し、DNAフラグメントを変性（即ち両鎖を分離）した後、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本発明のプローブの1種をDNAフラグメントと接触させ、ハイブリダイゼーションの終了に達するために必要な時間後、ハイブリダイズしなかったフラグメントをハイブリダイズしたフラグメントから分離し、細胞検出について上述のようにラベルを検出する。

一般に、異種DNAの存在が該当用途でプローブの特異性を損なわなければ、クロニングを可能にする組織DNA中に本発明の種々のプローブを含むこともできる。

図1～図10には、種々の微生物中で発見されたスペーサー領域のアライメント（全部または一部を配列したもの）が例として示されている。対（match）及び空所（gap）は各々、“+”及び“-”で表されている。総ての配列に関して、非-コードストランドは、その5' - 3'配列で示されている。

5'末端は、16S rRNA遺伝子の近位であり、3'末端は、23S rRNA遺伝子の近位である。

図1～図10に参照される各生体（*E. coli*の1種を除く）の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の各核酸配列は、新規であることは指摘されねばならない。

図1には、*Neisseria gonorrhoeae* 株 NCTC 8375（上列）及びITM 4367（下列）の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の16S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

図2には、*Bordetella pertussis* ATCC 10380（上列）及び*Bordetella bronchiseptica* NCTC 452（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図3には、*Neisseria meningitidis* NCTC 10025（上列）及び*Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図4には、*Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375（上列）及び*Bordetella pertussis* ATCC 10380（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図5には、*Branhamella catarrhalis* ITM 4197（上列）及び*Neisseria gonorrhoeae* NCTC 8375（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図6には、*Haemophilus ducreyi* CIP 542（上列）及び*Escherichia coli*（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図7には、*Branhamella catarrhalis* ITM 4197（上列）及び*Moraxella nonliquefaciens* ATCC 19975（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図8には、*Haemophilus influenzae*（パイオグループ *influenzae*）NCTC 8143（上列）及び*Haemophilus influenzae*（パイオグループ *paratyphus*）ITM 859（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図9には、*Streptococcus pneumoniae* S90-5122（上列）及び*Streptococcus agalactiae* U90-2817（下列）の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図10には、*Campylobacter jejuni* ATCC 33560（上



列)及びCampylobacter coli ATCC 33559 (下例)の16Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の23S rRNA近位端の核酸配列アライメントが示されている。

使用した株は、各々培地コレクション:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA.

CIP: Collection de l' Institut Pasteur, Paris, France.

ITM: Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

NCTC: National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom.

から入手し得る。

以下の実施例は、本発明のプロブの製造法及び種々のハイブリダイゼーションプロトコルを使用するプロブの特異性及び感度に関する実験結果に関する。臨床に適当な以下の生体: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Branhamella catarrhalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*及び*Bordetella pertussis*を選択した。

実施例は、種一特異性で感度の高いプロブが、研究した総ての生体のスペーサー領域に容易に知見されたことを示している。さらに、種一特異性で感度の高いプロブが16S及びまたは23S rRNA分子に知見されない生体のこの領域からプロブが特異的に結合することを示している。使用した方法は、他に記載しない限り、ROSSAUらのJ. Gen. Microbiol., 135: 1735-1745, 1989または欧州特許出願第8940/045. 3に記載の方法と本質的に同一である。rRNA遺伝子フラグメントの酵素増幅法及び逆ハイブリダイゼーションを除く総ての方法は現在当業者に公知である。16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるrRNA遺伝子フラグメントの酵素増幅法は、Perkin Elmer Cetusの"Gene Amp"キットに推薦される方法に従って実施したポリメラーゼ鎖反応法 (PCR) により得られた。rRNA分子中に保存されたまたは半分保存された (semi-conserved) 領域に対応するヌクレオチドをPCRプライマーとして使用した。逆ドットプロット法の原理及びプロトコルは、Saikiら (1989) により記載されている。

実施例1

*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*の両方は、各々髄膜炎及び淋疾に関連する重要なヒト病原体である。これらの生体は非常に密接に関連しており、互い及び他の*Neisseria*種との差別化は間違いない。*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*に特異的なDNAプロブは、両方の*Neisseria*種の間の正しい差別化を速め且つ臨床サンプル中でこれらの種を直接検出するために使用し得る。

*Neisseria gonorrhoeae*を検出するために多くのDNAプロブについて記載されてきた (欧州特許出願第0272 09号及び同第0337 896号; URDEAら, Clin. Chem. 35: 1571-1575, 1989; TOTTENら, J. Infect. Dis. 148: 462-471, 1989; DONEGANら, Mol. Cell. Probes 3: 13-26, 1989; KOLBERGら, Mol. Cell. Probes 3: 59-72, 1989)。しかしながら、これらのプロブの内の幾つかは、非-*Neisseria gonorrhoeae*株と交差するか、感度が著しく低いことが知見された。これらのプロブは総て16S-23S rRNAスペーサー領域由来ではなかった。

*Neisseria meningitidis*株を検出するDNAプロブも報告された (KOLBERGら, Mol. Cell. Probes 3: 59-72, 1989)。 *Neisseria gonorrhoeae*のピリン遺伝子から誘導されたこのプロブも、*Neisseria meningitidis*に関して非常に特異性でもなく感度も高くはなかった。

*Neisseria gonorrhoeae*及び*Neisseria meningitidis*型株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列を、スペーサー領域を広げるPCRフラグメント由来のクローン化した物質を使用して決定した。図3に示されている両方の列から、幾つかの潜在的なプロブ配列が明らかになった。

約60塩基対の予想外の挿入配列を、*Neisseria meningitidis*株のスペーサー領域中に検出した。以下の配列:

GGTCAAGTGT GACGTCGCC TC NMI 1

GTCTTGGTC AAGTGTGACG TC NMI 2

を有するオリゴヌクレオチドを、この挿入した配列から誘導した。

(図3の*Neisseria meningitidis*配列の塩基対365-386由来の) スペーサー領域のもう1つのエリアでも、*Neisseria meningitidis*と*Neisseria gonorrhoeae*との間で

CGGTTGGTTA TAGCTATCTA CTGTGC NMI 3

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC NMI 1

が化学的に合成された。

これらのヌクレオチドを、ポリヌクレオチドキナーゼ

かなりの度合いで食い違いが明らかになった。このエリアから、2種類のオリゴヌクレオチドプロブ (*Neisseria meningitidis*及び*Neisseria gonorrhoeae*の検出用のNMI3及びNMI1) :

を使用してその5'末端を<sup>32</sup>Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してその3'末端で

ジゴキシゲニル化したUTPと結合して、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、種々の位置由来の多くのNeisseria meningitidis及びNeisseria gonorrhoeae株由来のドットスポットした変性ゲノムDNA及び他の細菌 (bacterial taxa) 由来の幾つかの株を使用した。

ハイブリダイゼーション混合物は、3×SSC、25mMリン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド (20%, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン (0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02%, w/v) 及びシアアをかけて変性したサケ精液DNA (0.1mg/ml) であるか、または5×SSCの代わりに3×SSC (1×SSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0) を使

用し且つホルムアミドを20% (v/v) まで添加した以外には、非-放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer Mannheim製) のプロトコルシートの溶液であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩緩衝液pH7.1を含んでいた。

ハイブリダイゼーションの結果は、以下の表にまとめられている。各プローブ毎のハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、括弧内に示されている。試験した総のプローブは、Neisseria gonorrhoeae (プローブNG11) またはNeisseria meningitidis (プローブNM11, NM12及びNM13) に対し非常に特異的で且つ感度が高かったことが証明された。

分 類	陽 性 株 数 / 試 験 株 数			
	NMI1 (45°C)	NMI2 (45°C)	NMI3 (40°C)	NG11 (50°C)
<i>Neisseria meningitidis</i>	52/53	10/11	56/56	0/11
<i>Neisseria</i> sp ATCC 43831	1/1	1/1	1/1	0/1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0/16	0/9	0/10	10/10
<i>Neisseria polysacchara</i>	0/3	-	0/3	0/3
<i>Neisseria lactamica</i>	0/10	-	0/10	0/10
<i>Neisseria cinerea</i>	0/4	-	0/4	2/4
<i>Neisseria mucosa</i>	0/3	-	0/3	0/3
<i>Neisseria macacae</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria flavescens</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria subflava</i>	0/2	-	0/2	0/2
<i>Neisseria sicca</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria elongata</i>	0/2	-	0/2	0/2
<i>Neisseria canis</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria animalis</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria denitrificans</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Neisseria</i> sp	0/5	-	0/4	0/3
CDC group M-5	0/1	-	0/1	0/1
CDC group EF-4a	0/1	-	0/1	0/1
<i>Kingella denitrificans</i>	0/2	-	0/1	0/1
<i>Kingella kingae</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella muelleri</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella crassa</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella steedae</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Simonsiella</i> sp	0/1	-	0/1	0/1
<i>Akxiella filiformis</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Eikenella corrodens</i>	0/2	-	0/2	0/2
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Jodobacter fluvialis</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Aquaspirillum dispar</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Comamonas testosteroni</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Haemophilus influenzae</i>	0/1	-	-	-
<i>Haemophilus ducreyi</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Kingella indologenes</i>	0/1	-	0/1	0/1
<i>Moraxella lacunata</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0/3	-	0/2	0/2
<i>Moraxella cuniculi</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella caviae</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella ovis</i>	0/1	-	-	-
<i>Moraxella osloensis</i>	0/1	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	0/1	0/1	0/1	0/1

NMI3及UNG13で検出する特異性を、16S rRNA遺伝子の いる以下の増幅プライマー:

3' 末端及び23S rRNA遺伝子の5' 末端に各々配置して

TGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

AP16

とのスペーサー領域の酵素増幅後においてもチェックした。Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Haemophilus ducreyi, Bordetella pertussis及びBrachyella catarrhalisの株由来のゲノムDNAの100ナノグラムをPCR反応に使用した。増幅後、収量の1/10をアガロースゲルに装填し、電気泳動させ、ナイロン膜上にプロットした。

続いてこの膜をプローブNG11及びNM13でハイブリダイズした。

各々NG11またはNM13をプローブとして使用したとき、Neisseria gonorrhoeaeまたはNeisseria meningitidis物質が存在するレーンだけにはっきりしたハイブリダイゼーションシグナルが検出できた。

#### 実施例2

Bordetella pertussisは、百日咳の原因となる因子である。再度の予防接種キャンペーンにより、この病気は先進国では殆ど問題ではない。しかしながら第3世界の国々に於いては、Bordetella pertussisは、幼児の致死率のトップである。

3種類のBordetella種 (Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica) の株は非常に関連しているので (KLOOSら, Int. J. Syst. Bacteriol. 31:173-176, 1981; DE LEYら, Int. J. Syst. Bacteriol. 36:405-414, 1986)、ひとつの遺伝子種に属するものとして考えるべきである。この遺伝子型の間は、これらの細菌の他の多くの特徴にも反映するので、その表現型の差別化が冗長となる。

百日咳の臨床兆候はたいがい非定型であり、検査室診断が必要である。感度が高く、特異的に迅速な試験はまだ無い。培地には選択方法が残っているが、回収率は低く且つ結果は通常、接種後3〜7日しか有効でない (FRIEDMAN, Clin. Microbiol. Rev. 4:365-376, 1988; HALPERIN

ら, J. Clin. Microbiol. 27:752-757, 1989)。DNAプローブベースの分析は、Bordetella pertussis感染の診断を非常に改良し得る。

Bordetella pertussisの検出用プローブは、文献 (PARKEら, FEMS Microbiol. Lett. 52:19-24, 1988; McPHEAT及びMcNALLY, J. Gen. Microbiol. 133:323-330, 1987及びFEMS Microbiol. Lett. 41:357-360, 1987; McLAFFERTYら, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology C-168, 1986及びC-322, 1987)に記載されている。McLAFFERTYら (1986及び1987)に記載のプローブは、特異性が高くない。記載の他のプローブに関しては、示されたデータは特異性及び感度の適合性を推論するには不十分である。

以下の株のリボソームRNA遺伝子の一部を酵素的に増幅し、プラスミドベクター:Bordetella pertussis ATCC 10380, Bordetella parapertussis NCTC 5952 (型株)及びBordetella bronchiseptica NCTC 452 (型株)にクローン化した。種々の種類のクローン化したフラグメントを、ジデオキシ鎖停止法を使用して一部配列し、その配列を比較した。16S rRNA遺伝子に拘わる配列情報は、種-特異性プローブが与えられないことを示している (ROSSAUら, 未発表)。しかしながら図2のアライメントに示されたように、相同でないエリア (271塩基対〜約300) がBordetella pertussis及びBordetella bronchiseptica株の16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域に知見された。

Bordetella parapertussis株のスペーサー領域の配列は、Bordetella bronchiseptica配列と大体同一である (ROSSAUら, 未発表)。

Bordetella pertussisのスペーサー領域のヌクレオチド271と295との間のエリアから、以下の配列:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT

BPI 1

を有するオリゴヌクレオチドプローブを誘導した。

オリゴヌクレオチドプローブを化学合成し、ターミナルトランスフェラーゼを使用してジデオキシゲン-UTP

でラベルした。ターゲットとしてドットブロットし、変性したゲノムDNAで得られた結果を以下の表にまとめた。

	陽性株数/試験株数
<u>Bordetella pertussis</u>	4/4
<u>Bordetella parapertussis</u>	0/3
<u>Bordetella bronchiseptica</u>	0/3
<u>Alcaligenes denitrificans</u>	0/1
<u>Alcaligenes paradoxus</u>	0/1
<u>Oligella ureolytica</u>	0/1
<u>Oligella urethralis</u>	0/1
<u>Taylorella equigenitalis</u>	0/1
<u>Pseudomonas cepacia</u>	0/1
<u>Pseudomonas solanacearum</u>	0/1
<u>Comamonas testosteroni</u>	0/1
<u>Neisseria meningitidis</u>	0/1
<u>Branhamella catarrhalis</u>	0/1
<u>Haemophilus influenzae</u>	0/1

使用条件下に於いて、Bordetella pertussis Bordetella pertussisに対し100%特異性で且つ100%の感度であることを証明した。

ハイブリダイゼーション混合物は、5×SSCの代わりに3×SSC (1×SSC:0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0) を使用し、ホルムアミドを20% (v/v) まで添加したことを除いて、非-放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer Mannheim製) のプロトコルシートに記載のものと同一であって、洗浄液は3×SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は55℃であった。

逆ドット-プロット分析を利用すると、上記表に示されているのと本質的に同一結果が得られた。この分析は以下のようを実施した：

異なる細菌種から得られた種々の株からの殺菌DNAIngを、ジオキシゲニン-11-dUTP (Boehringer Mannheim) を増幅混合物に添加して最終濃度40 μMとした以外には、GeneAmpキット (Perkin Elmer Cetus) の製造業者により推奨されるように酵素的に増幅した。プライマーAP16及びAP23 (実施例1参照) を用いて全部で50 μlで30サイクル (1分/95℃, 1分/50℃, 1分/72℃) 実施し、その後各PCR混合物の5 μlを膜の存在下にハイブリダイゼーション混合物 (上記定義通りの組成物) 1mlに添加し、これにプローブBPI1の0.2pmol、0.02pmol及び0.002pmolを固定した。ハイブリダイゼーションを55℃で1時間実施した。洗浄工程を同一温度で10分間実施した。非-放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer Mannheim製) に記載の如く検出した。ゲル電気泳動及び逆ドット-プロットプロトコルを使用する臭化エチジウム染色後に実験した全サンプル中にはっきりしたバン

ドを検出したが、もっぱらBordetella pertussis DNAが存在するサンプルにはっきりした陽性シグナルが得られた。

#### 実施例3

Moraxella catarrhalisまたはNeisseria catarrhalisとも知られるBranhamella catarrhalisは、特殊培養を必要とする生化学的に不活性な細菌である。近年、その重要な病原体としての潜在能力が認識された。

Branhamella catarrhalisは、重い気道感染症によく含まれる (HAGERら, Rev. Infect. Dis. 9:1140-1149, 1987)。Branhamella catarrhalisの診断には、特殊培養を必要としない微生物による異常増殖により阻止されるこの生体の培地と、この生体と口腔内に存在する共動生物 (例えば、Neisseria種など) とを区別するための一組の表現型試験器具が必要である。

時々、表現型が類似の細菌由来のBranhamella catarrhalisを差別化する試験が限られているので、表現型試験は、推定上のBranhamella catarrhalis半離物の識別に関しては決定的ではない (RIOU及びGUTHRIED, Dis. 31 [補遺 3] :1-6, 1986)。分析に基づいてDNAプローブを使用すると、Branhamella catarrhalisの検査室診断をかなり簡素化できる。未特定DNAフラグメントから誘導し、Neisseria caviae由来のDNAで交差ハイブリダイズしたBranhamella catarrhalis用とDNAプローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている (Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No. D-249, 1989)。

Branhamella catarrhalis ITG 4197のrRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ鎖反応法により酵素的に増幅させ、プラスミドベクターにクローニングした。続いて16S-23S rRNAスペーサー領域を広げるフラグメントをジデオキ

シ鎖停止法により配列した。この配列は図7に示されて  
いる（上列）。配列データより、以下のオリゴヌクレオ

TTAAACATCT TACCAAG

を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5'末端でポリヌクレ  
オチドキナーゼで<sup>32</sup>Pラベルし、ハイブリダイゼーシ  
ョンプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる  
位置の31 *Branhamella catarrhalis*株及び他の細菌分類  
の19株のドットスロットした。変性ゲノムDNAを使用  
した。

ハイブリダイゼーション混合物は、3×SSC (1×S  
SC: 0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム, pH7.0)、  
25mMリン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムア  
ミド (20%, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清ア  
ルブミン (0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02  
%, w/v) 及びシアアをかけた変性したサケ精液DNA (0.1  
mg ml<sup>-1</sup>) であった。洗浄液は、3×SSC、20%ホルムア  
ミド及び25mMリン酸緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイ  
ブリダイゼーション及び洗浄温度は、30°Cであった。

使用条件下で、プローブBCI1を総ての*Branhamella ca*  
*tarrhalis*株にハイブリダイズした。他の細菌種の属す  
る試験した株は総て、このプローブに対し強いハイブリ  
ダイゼーションシグナルを与えなかった。

試験した非-*Branhamella catarrhalis*株は：

<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17967
<i>Moraxella lacunata</i>	ATCC 17952
<i>Moraxella bovis</i>	ITM 1601
<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	ATCC 19975
<i>Neisseria cuniculi</i>	ITM 3358
<i>Neisseria ovis</i>	NCTC 11227
<i>Neisseria caviae</i>	ATCC 14659
<i>Alsiella sp.</i>	ATCC 29468

TTATTATGCG CGAGGCATAT TG

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末端で<sup>32</sup>Pラベルする  
か、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジ  
ボキシン化UTPでその3'末端を結合し、ハイブリダイ  
ゼーションプローブとして使用した。

ターゲットとして、種々の位置からの41 *Haemophilus*  
*ducreyi*株及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ド  
ットスロットした変性したゲノムDNAを使用した。総  
ての*Haemophilus ducreyi*株にもつぱらハイブリダイズ  
したオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション混合物は、5×SSCの代わ  
りに3×SSC (1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナ  
トリウム, pH7.0) を使用し、ホルムアミドを20% (v/v)  
まで添加したことを除いて、3×SSC、25mMリン酸カリ  
ウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド (20%, v/

チド：

BCI 1

<i>Moraxella osloensis</i>	LMG 1043
<i>Moraxella osloensis</i>	ATCC 17974
" <i>Moraxella paraphenylypruvica</i> "	LMG 5125
" <i>Moraxella camembertii</i> "	LMG 7022
<i>Psychrobacter immobilis</i>	LMG 6784
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23005
<i>Escherichia coli</i>	B
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8143
<i>Eikenella corrodens</i>	NCTC 10596
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	LMG 958
<i>Xanthomonas campestris</i>	LMG 568

であった。

実施例4

軟性下疳の原因となる*Haemophilus ducreyi*は、特殊  
培培养基を必要とするグラム陰性細菌である。この生体の  
培地は、困難で且つ感度が無いが、依然として、*Haemop*  
*hilus ducreyi*感染の診断のための選択方法である。特  
異性の高いプローブを使用すると、培地が不要で且つ診  
断の感度が強くなる。他の*Haemophilus*及び*Pasteurella*  
種と弱い交差反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子  
をターゲットとする*Haemophilus ducreyi*用のクローン  
化したDNAプローブは、PARSONSらにより記載されている  
(J. Clin. Microbiol. 27:1441-1445, 1989)。

*Haemophilus ducreyi* CIP 542型株のrRNA遺伝子の一  
部をポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅し、プラス  
ミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列  
は、ジデオキシ鎖停止法により得られた。核酸配列よ  
り、以下のオリゴヌクレオチド：

HDI 1

v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン (0.0  
2%, w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02%, w/v) 及び  
シアアをかけた変性したサケ精液DNA (0.1mg ml<sup>-1</sup>) ま  
たは、非-放射性DNAラベル及び検出キット (Boehringer  
r Mannheim製) のプロトコルシートに溶解であった。洗  
浄液は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mMリン酸塩  
緩衝液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及  
び洗浄温度は、40°Cであった。

試験した非-*Haemophilus ducreyi*株は：

<i>Escherichia coli</i> MC 1061
<i>Escherichia coli</i> B
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> NCTC 9710
<i>Actinobacillus lignieresii</i> NCTC 4189
<i>Haemophilus aphrophilus</i> NCTC 5906
<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8143

*Histophilus ovis* HIM 896-7  
*Pasteurella multocida* NCTC 10322  
*Branhamella catarrhalis* ITM 4197  
*Comamonas testosteroni* ATCC 17407  
*Oligella urethralis* LMG 6227  
*Neisseria gonorrhoeae* ITM 4437  
*Campylobacter jejuni* CCUG 11284  
*Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 23055  
 未識別株 ITM 3565  
 であった。  
 実施例 5

グラム陰性細菌種 *Haemophilus influenzae* は、2 種類の  
 バイオグループ: *influenzae* 及び *aegyptius* に分類する  
 ことができる (Casinら, Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 1  
 37B:155-163, 1986)。 *influenzae* バイオグループの生  
 体は、重要な呼吸器道の病原体であり、子供の脳膜炎及  
 び耳炎の原因でもある。 バイオグループ *aegyptius* 単離

物は、暑い気候では、細菌性結膜炎の原因として作用す  
 る因子であり、ブラジルの熱帯熱と関連しているらしい  
 (Brennerら, J. Clin. Microbiol. 26:1524-1534, 198  
 8)。 分類可能な及び非分類可能な *Haemophilus influ*  
*enzae* は、核酸プローブにより迅速に検出され得る。

この種の DNA プローブは、文献に記載されている (Ter  
 pstraら, Scand. J. Infect. Dis. 19:641-646, 1987; Maloui  
 なら, J. Clin. Microbiol. 26:2132-2138, 1988)。 これら  
 のプローブは 16S-23S rRNA プレーサー領域から誘導さ  
 れているものではない。

*Haemophilus influenzae* NCTC 8143 型株の rRNA 遺伝式  
 の一部を、ポリメラーゼ鎖反応により酵素的に増幅さ  
 せ、次いでプラスミドベクターにクローニングした。

16S と 23S rRNA 遺伝子との間のスプレーサー領域の配列  
 がジデオキシ鎖停止法により得られた。 核酸配列か  
 ら、以下のオリゴヌクレオチド:

ACGCATCAAA	TTGACCGCAC	TT	HII 1
ACTTTGAAGT	CAAAACTTAA	AG	HII 2

を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその 5' 末端で <sup>32</sup>P ラベルし、  
 ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。 ター  
 ゲットとして、細菌の分類単位のドットスロットし  
 た、変性したゲノム DNA を使用した。

両方のプローブを使用したハイブリダイゼーション結  
 果を以下の表にまとめた。 使用したハイブリダイゼーシ  
 ョン及び洗浄温度では、プローブ HII1 は *Haemophilus in*  
*fluenzae* バイオグループ *aegyptius* 株にハイブリダイズ  
 しなかった。 プローブ HII2 は、両方のバイオグループの  
 株にハイブリダイズした。 両方のプローブは、表示温度

で、Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium  
 から得た他の 15 種類の *Haemophilus influenzae* バイオグ  
 ループ *influenzae* の臨床単離物にもハイブリダイズし  
 た。

ハイブリダイゼーション混合物は、3 × SSC、25mM リ  
 ン酸カリウム緩衝液、pH7、脱イオン化ホルムアミド (20  
 %, v/v)、Ficoll (0.02%, w/v)、ウシ血清アルブミン  
 (0.02%, w/v)、ポリビニルピロリドン (0.02%, w/v)  
 及びシアアをかけた変性したサケ精液 DNA (0.1mg m  
 l<sup>-1</sup>) であった。 洗浄液は、3 × SSC、20% ホルムアミド  
 及び 25mM リン酸塩緩衝液 pH7.1 を含んでいた。

分類単位	アローブ	
	HI11(50℃)	HI12(30℃)
<u>Haemophilus influenzae</u> (ハイザル-フ <u>influenzae</u> )NCTC 8143	+	+
<u>Haemophilus influenzae</u> (ハイザル-フ <u>influenzae</u> )ITM 3837	+	+
<u>Haemophilus influenzae</u> (ハイザル-フ <u>argyptius</u> )ITM 859	-	+
<u>Haemophilus parahaemolyticus</u> ITM 402	-	-
<u>Haemophilus parainfluenzae</u> ITM 1094	-	-
<u>Haemophilus aphrophilus</u> NCTC 5906	-	-
<u>Haemophilus ducreyi</u> CIP 542	-	-
<u>Pasteurella multocida</u> NCTC 10322	-	-
<u>Pasteurella picida</u> ATCC 17911	-	-
<u>Actinobacillus lignieresii</u> NCTC 4189	-	-
<u>Actinobacillus actinomycetemcomitans</u> NCTC 9710	-	-
<u>Histophilus ovis</u> HIM 896-7	-	-
<u>Pseudomonas cepacia</u> ATCC 25609	-	-
<u>Actinetobacter calcoaceticus</u> ATCC 23055	-	-
<u>Branhamella catarrhalis</u> LMG 5128	-	-
<u>Bordetella pertussis</u> NCTC 8189	-	-
<u>Escherichia coli</u> B	-	-
<u>Neisseria meningitidis</u> NCTC 10025	-	-



【第1図】

```

AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -50

TGC GGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTGCTTAAAGAAGGAAACCGG -100
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGC GGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTGCTTAAAGAAGGAAACCGG -100

GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGTCGGA -150
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGTCGGA -150

GGTTCAAGTCCTCCAGACCCACCAAGAACGGGGGCATAGCTCAGTTGGT -200
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GGTTCAAGTCCTCCAGACCCACCAAGAACGGGGGCATAGCTCAGTTGGT -200

AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCCGTTGCGCT -250
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTTCGATCCCGTTGCGCT -250

CCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAGCTTAT -300
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAGCTTAT -300

TTTGATTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTTGATTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC

```

【第9図】

```

AAGGATAAGGAA--CTGCGCATTG-GTCTTGTTTAGTCTTGAGAGGTCTT -47
:::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
AAGGATAAGGAAACCTGCCATTTGCGTCTTGTTTAGTTTGAAGAGGTCTT -50

GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC -97
:::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
GTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGTC -100

AGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGGTGAGAGATCACCAGTAATGC -147
:::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
AGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATTGAATCGAAAGGTTCAAAT--TGT -148

ACATTGAAAATTGAATATCTATATCAAAT----- -176
:::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
TCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATCCACGATCTAGAAATAGATT -198

-----AGTAACAAGAAAATAAACCGAAAACGCTGT-AGTATT-AATAAG -218
:::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::
GTAGAAAGTAAACAGAAAATAAACCGAAAACGCTGTGAATATTTAATGAG -248

AGTTTATGACTGAAAGG---TCAGAAAATAA -246
:: : : :::: : : ::::
TTTTCTAGTTTTAAAGAAACTAGGTTAATAA -279

```

```

AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCACGCTTATCGGTTGTTGTTAT -50
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCACGCTTATCGGTTGTTGTTAT -50

ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAAGGTTTCGCGGG -100
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAAAAGGTTTCGCGGG -100

TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGTCGTTG -150
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGTCGTTG -150

GTTTCAATCCAACAGACCCACCAAGGTTTCTTGAGAGGGAATGGGGGT -200
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTTTCAATCCAACAGACCCACCAAGGTTTCTTGAGAGGGAATGGGGGT -200

GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTT -250
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTT -250

GATCCCGTTACCTCCACCAAAGCCTGTCCAGAGGATGGGTGTGNNNG- -299
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GATCCCGTTACCTCCACCAAGCCGCTTGAAGATGGGAGCGGGTTGG -300

-----AGACCAG--AAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG -342
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CAGGCGAGACCAGGAAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG -350

TTAAGCGTTGGGTTTTGGCCGACAGCTATATATGTTCTTTAACAATTTGG -392
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTAAGCGTTGGGTTTTGGCCGACAGCTATATATGTTCTTTAACAATTTGG -400

AAGAAGCACAACGTAAGTGTTTCGTTTAGTAGTCGGCGGAGTCGATGAA -442
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAGAAGCACAACGTAAGTGTTTCGTTTAGTAGTCGACGCGAGTCGATGAA -450

GACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTCGAAGTCTCAAGAAGTG -492
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTCGAAGTCTCAAGAAGTG -500

GCTGGGCGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACCTTATGAACGGCACA -542
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GCTGGGCGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACCTTATGAACGGCACA -550

AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG -582
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG -590

```

[illegible]

[illegible]

[illegible]

```

C----- -1
:
CTTAACCTTCGGGAGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGA -50
-----CAAAATAA---AG---AC-----ATCAC----- -18
      :::  :::  ::  ::  ::::
AGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA -100
-----AAGTA-----CTCACACAGATTGTTTGATTGTTT -48
      :::  :::::
CCTTAAGAAGCGTACTTTGTAGTGCTCACACAGATTGTCTGATAGAAAG -150
AGA---CAAGTCG-----GAATA----- -63
      ::  ::::  ::  ::::
TGAAAAGCAAGGCGTTTACGCGTTGGGAGTGAGGCTGAAGAGAATAAGGC -200
CAT---CTTT-----AAATGT----- -76
:  :  ::::  ::::  :
CGTTCGCTTTCTATTAATGAAAGCTCACCCCTACACGAAATATCACGCAA -250
-----TGCCCCATCTGTCTAGAGGCCTAGGACAT -106
      :::::  ::  :::::
CGCGTGATAAGCAATTTTCGTGTCCCCCTTC-GTCTAGAGGCCACGACAC -299
CGCCCTTTACGCGGTAACCGGGGTTTCAANCCCC--GTGGACGCCATC -154
:::
CGCCCTTTACGCGGTAACAGGGGTTTCAATCCCTAGGGGACGCCA-C -348
TAAAGATGATTTT-ATTGTCTTATGTT--CTTTAAAAAATAGAAACAA -201
:  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
TT--GCTGGTTTGTGAGTGAAAGTCGCCGACCTTAATATCTCAAACTCA -396
GCT---GAAACTGAGAGATTTTCTAAAGTAGAAAGTCTGAGT-AATCT -246
:  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
TCTTCGGGTGATGTTTGAGATNTTGTCTTTAAAAATCTGGATCAAGCT -446
AAAACTCTAG--CTGAACAAAAGCAGCTAAGTGTTTATGCTAAATCATT -293
:  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
GAAAATTGAACACTGAACAACGAGAGTTGTTCTGTG-AGTCTCTCAAAAT -495
AACCACAAGTATATCAATATGCCTCGCGCATAATAAAATACTTGAGGTTG -343
:  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
TTCG-CAACACGAT---GATGAATCGA---AAGAAACATCTTCGGGTTG -537
TAT -346
:
TGA -540

```

ACGAAGTTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTGTGTTCTTTGGTAAG -50  
:::  
ACGAGATTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTGTGTTCTTAG-TAGT -49

ATGTTTAAAAACGGGTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTTGATA -100  
:  
GTAAGTTAAATTGGGTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGGCTTGATA -99

ACGCGGGGGTCATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGCCA -150  
:  
AGCGGGGGTCATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGTTA -149

TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTcAGGAGTTCG -200  
:  
TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTcAGGAGTTCG -199

ACTCTCCTTGGCTCCACCAAGCAAGTTAA--ACATCAAAGCATACATAA -248  
:  
ACTCTCCTTAACTCCACCACCTTACAATAAATGAGAACTAAGCAATCAAAT -249

GCAAT----TTAAATAAGATTTCCTATTATTATGCITT--TATTTTA--TA -289  
:  
TAGATAACATAAAAATTAGATTTCCTACTTCTACTTTATGTAGATGACTTA -299

-----AACTGACGAAGTTTATAACA-TTATTTAAACAACATAG-TATGAGT -332  
:  
CAATTAAGCTGATGAAGTTAAATTCAATTATTTTAAACAAGCTATATATGAGT -349

CTGGGTAAATTATTTAATTCCAACAAATAATTAACTGGTGTtTGTA-C -381  
:  
CTGGGTAAATTATTTAATTCCAACAAATAATTAACTTCCGTCATACTC -399

CA-----ATACAAACACCAAA-----A -398  
:  
CACATCAAGCATATAAAGTTAAACCTTTTAGTATTGATGATGATCGGATA -449

AAGTAAAGAGAAGCTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT -448  
:  
AAGTAAAGAGAAGCTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT -499

ACCCATACACACCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTtTGTA -498  
:  
ACCCATACACACCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTtTGTA -549

CTGAAGACGAGAGACAGCGAGTGCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50  
::: :  
CCCAAGACGAGAGACAGCGAGTGCTCACACAGATTGGCTGATAGTTGTAG -50

ACAAGATTAAAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAG -100  
::: :  
ACAAGATTAAAAACGAAGCGAAAGCAACGTTGAAAAATAAACGTTAAAAG -100

ATAAAAAGAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCCTCGTCTAGAGGC -150  
::: :  
ATAAAAAGAAAATAGAGTATCTTTAATTGATGTCCCCTCGTCTAGAGGC -150

CTAGGACATCGCCCTTTCACGGCGGTAACCGGGGTTGGAATCCCCGTGGG -200  
::: :  
CTAGGACATCGCCCTTTCACGGCGGTAACCGGGGTTGGAATCCCCGTGGG -200

ACGCCAATTAAAGATAACTTTATTAGATTGCTTACTGTTCTTTAAATTT -250  
:::::  
ACGCCANNNNNNNNNNNTTTATTAGATTGCTTACTGTTCTTTAAAAAA -250

TGGAACAACAGCTGAAAACAAGAGATTTTCGAGAGAAGTCTGAGTAGGC -300  
::: :  
TGGAACAACAGCTGAAAACAAGAGATTTTCGAGAGAAGTCTGAGTAGGC -300

AAGATAGGAAAGTGAGAGGAGGGAAGTCTGAAAAGGGAAGTCTAAAAACAA -350  
::: :  
AAGACAGGAAAGTGAAAAGAGGGAAGTCTGAGAAGGGAAGTCTAAAAACAA -350

ACCTGTTTTGCATAAAA-TCTTGATTGAACAAAAGCAATCAAGTGTTTGA -399  
::: :  
-CCTGTTTTGTAAAAAATCTTGATTGAACAAAAGTAATCAAGTGTTTGA -399

TGGAATGAAAAATCGCATCAAATTGACCGCACTTTGAAAGTGAAAACTTAA -449  
::: :  
TGGAATTAA--TGAGGCTGAAAGTGCACTCAAAGTACGGTATCTATTTTA -447

-AGTGA---TTGAAAACATTTGAGGTGAT -474  
::: :  
TATTGAGTTTTTGAAAACATTTGANNNNNN -476



```

TAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAATATAAAATACAAACTC -50
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAATATAAAATACAAACTC -50

TATACTTAGATTATTTTTATCTTTAACTATAAAGAATATACTTTAATA -100
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TATACTTAGATTATTTTTATCTTTAACTATAAAGAATATACTTTAATA -100

AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTTATAATGAGATTATTT -150
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTTATAATGAGATTATTT -150

AATATATATGCTTCCTTTAGGTTTTAAACCTAAATGTTCTTTTTTAATTAT -200
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AATATATATGCTTCCTTTAGGTTTTAAACCTAAATGTTCTTTTTTAATTAT -200

CATTGTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTAAATAAAAAACAATTTACAGGACT -250
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
CATTGTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTAAATAAAAAACAATTTACAGGACT -250

TGTTAAAGGATAAAACCTATTTATCTTTTCTTTGGTTAACTTATATCTT -300
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TGTTAAAGGATAAAACCTATTTATCTTTTCTTTGGTTAACTTATATCTT -300

TTAATTATCTTTATTTCTATAATAAAGAGAATATTAGATTAAAGATTAT -350
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TTAATTATCTTTATTTCTATAATAAAGAGAATATTAGATTAAAGATTAT -350

AAATTAAGACAAAGTTTCAAACCTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT -400
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AAATTAAGACAAAGTTTCAAACCTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT -400

AGTTTATATTAAGTGTTTGAATGCTTTCCGCTTTAAGATAAAGAAGTCT -450
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
AGTTTATATTAAGTGTTTGAATGCTTTCCGCTTTAAGATAAAGAAGTCT -450

TATCATAAAAACTTTAACAAGGAAGTGATGCGTTTTAGAATCAATAATAA -500
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
TATCATAAAAACTTTAACAAGGAAGTGATGCGTTTTAGAATCAATAATAA -500

AAGGTAaaaaaa -511
::::::::::::::::::
AAGGTAaaaaaa -511

```

フロントページの続き

(72)発明者 バン・フーベルスウイン、ヒューホ  
ベルギー国、ペー—9288・ラルネ、コ  
ルマンストラート・62

(56)参考文献

特表 昭60—501339 (J P, A)  
「生化学辞典 第1版」東京化学同人  
(昭59. 4. 10) P. 1343  
Mol. Gen. Genet., 193  
(1984) P. 427—430